

CICLO MESTRADO EM CIÊNCIAS DO MAR – RECURSOS MARINHOS

ESPECIALIZAÇÃO EM AQUACULTURA E PESCAS

**A combinação simultânea de peixes larvívoros com
pesticidas como uma estratégia de controlo de
vetores da malária — Um estudo experimental com
Poecilia reticulata e três pesticidas**

Ana Rita Monteiro Ysenbout Mogas

M

2016



Ana Rita Monteiro Ysenbout Mogas

A combinação simultânea de peixes larvívoros com pesticidas como uma estratégia de controlo de vetores da malária — Um estudo experimental com *Poecilia reticulata* e três pesticidas

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Ciências do Mar - Recursos Marinhos, Especialização em Aquacultura e Pescas, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

Orientador – Eduardo Jorge Sousa da Rocha

Categoria – Professor Catedrático

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

Coorientador – Maria João Tomé Costa da Rocha

Categoria – Professor Auxiliar

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

AGRADECIMENTOS

Nesta secção gostaria de deixar algumas palavras de agradecimento a todos os que de alguma forma contribuíram para a finalização deste trabalho académico e etapa de vida. Assim é com um profundo sentimento de reconhecimento que agradeço:

Ao Professor Doutor Eduardo Rocha, enquanto meu orientador e como Diretor do Mestrado, pela disponibilidade, empenho e persistência em que eu levasse a cabo este projeto, nunca permitindo que eu desanimasse ao longo deste percurso. Sem o seu apoio, nunca teria sido capaz de concluí-lo.

À Professora Doutora Maria João Rocha, pela disponibilidade, apoio e orientação na realização deste projeto.

À minha mãe, ao meu pai e à minha irmã por acreditarem em mim, nas minhas potencialidades e me darem constantemente força para eu continuar, nunca permitindo que eu desistisse.

À Mestra Ivone Pinheiro, pelo apoio e colaboração na realização deste projeto.

À Lic^a. Nádía Oliveira e aos vários elementos do Grupo PATH, do CIIMAR, e do Laboratório de Histologia e Embriologia, do ICBAS, pela sua colaboração no projeto.

À minha amiga Francisca pela amizade, disponibilidade e apoio incondicional. Sem a sua ajuda os obstáculos teriam sido muito difíceis de ultrapassar.

Aos meus familiares e amigos, pelo incentivo, apoio e motivação constantes, que tanto me ajudou ao longo deste trabalho.

Este estudo foi parcialmente financiado pela FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia, via Financiamento Estratégico UID/Multi/04423/2013, incluindo o apoio do FEDER – Fundo Europeu para o Desenvolvimento Regional, no âmbito do programa PT2020. Também se agradece o financiamento do ICBAS, realizado através do seu Mestrado em Ciências do Mar – Recursos Marinhos. Adicionalmente, este trabalho também se insere no Programa Estruturado R&D&I INNOVMAR – “Innovation and Sustainability in the Management and Exploitation of Marine Resources” (Ref NORTE-01-0145-FEDER-000035), no âmbito da sua Linha de Investigação ECOSERVICES, integrada no Programa Operacional Regional do Norte (NORTE2020), via FEDER.



ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	07
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. A malária: origem e vetor de transmissão da doença	15
1.2. Ciclo de vida do mosquito <i>Anopheles</i> e relação com o meio aquático	17
1.3. Gestão ambiental no controlo do vetor da malária	19
1.3.1. Vantagens e desvantagens da gestão ambiental	20
1.4. Controlo químico do vetor da malária	20
1.4.1. Propriedades físicas, químicas e tóxicas do DDT	22
1.4.2. Propriedades físicas, químicas e tóxicas do Spinosade	23
1.4.3. Propriedades físicas, químicas e tóxicas do Abate	25
1.5. Controlo biológico do vetor da malária	25
1.5.1. Utilização de peixes larvívoros	26
1.5.2. O guppy (<i>Poecilia reticulata</i>) como agente de controlo biológico	27
1.5.3. Vantagens e desvantagens do controlo biológico	28
1.6. Ensaio toxicológico direcionados à fauna aquática	29
1.6.1. A artémia (<i>Artemia salina</i>)	31
1.6.2. Importância ecotoxicológica da artémia	32
1.7. Objetivos da dissertação	34
2. MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1. Ensaio de toxicidade aguda: Exposição de artémias a pesticidas (DDT, Spinosade e Abate)	35
2.1.1. Desenho experimental dos ensaios com artémia	36
2.1.2. Contagem e análise dos resultados de toxicidade aguda	37
2.2. Desenho experimental dos ensaios com guppies	38
2.3. Análise estatística	40
3. RESULTADOS	41
3.1. Exposição de artémia a pesticidas	41
3.1.1. Exposição da artémia a DDT	41
3.1.2. Exposição da artémia a Spinosade	42
3.1.3. Exposição da artémia a Abate	44
3.2. Exposição do guppy a pesticidas	45
3.2.1. Exposição do guppy a DDT	45
3.2.2. Exposição do guppy a Spinosade	48
3.2.3. Exposição do guppy a Abate	51
4. DISCUSSÃO	55
5. CONCLUSÕES	61
6. REFERÊNCIAS	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa mundial ilustrando os focos de prevalência da malária (UNICEF 2010).	15
Figura 2. Ciclo de vida do plasmódio, inicialmente no mosquito anófeles e posteriormente no Homem (guineveremedicina.blogspot.pt/2012/07/o-fim-da-malaria-drauzio-varella.html , acesso em 29 de setembro 2016).	16
Figura 3. Esfregaço de sangue humano infectado com o parasita da malária, <i>P. falciparum</i> . As formas escuras correspondem a gâmetas que, no mosquito, originam esporozoítos (upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fc/Plasmodium_falciparum_01.png , acesso em 29 de setembro 2016).	17
Figura 4. Ciclo de vida do mosquito <i>Anopheles</i> spp.; o potencial portador do parasita da malária (www.ocvector.org/InvasiveMosquitoes.html , acesso em 26 de setembro 2016).	18
Figura 5. Exemplares de guppy fêmea (A) e macho (B) (www.practicalfishkeeping.co.uk , acesso em 29 de setembro 2016).	28
Figura 6. Exemplares de artémia (<i>A. salina</i>) (www.flickr.com/photos , acesso em 29 de setembro 2016).	31
Figura 7. Ciclo de vida da artémia (www.learn.genetics.utah.edu , acesso em 26 de setembro 2016).	32
Figura 8. Berçário de artémia salina, concebido aproveitando uma garrafa plástica.	35
Figura 9. Exemplo da disposição dos meios de incubação nas placas para avaliação dos ensaios de toxicidade.	36
Figura 10. Estufa EHRET® usada nas experiências, contendo placas multi-poços.	37
Figura 11. Aquários usados nas experiências com guppies.	39
Figura 12. Taxa de mortalidade (%) da artémia exposta a DDT (concentrações agrupadas). As barras representam média \pm SE. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as condições testadas ($p < 0,05$).	41
Figura 13. Taxa de mortalidade (%) global da artémia nas experiências com diferentes concentrações de DDT (mg L^{-1}). As barras representam a média \pm SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.	42
Figura 14. Taxa de mortalidade (%) da artémia com diferentes idades, exposta a DDT (concentrações agrupadas). As barras representam a média \pm SE. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as condições testadas ($p < 0,001$).	42
Figura 15. Taxa de mortalidade (%) da artémia exposta a Spinosade (concentrações agrupadas). As barras representam a média \pm SE. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as condições testadas ($p < 0,001$).	43

Figura 16. Taxa de mortalidade (%) global da artémia nos ensaios com diversas concentrações de Spinosade (mg L ⁻¹). As barras representam a média ± SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.....	43
Figura 17. Taxa de mortalidade (%) da artémia com diferentes idades, exposta a Spinosade (concentrações agrupadas). As barras representam a média ± SE. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as condições testadas ($p < 0,001$).....	44
Figura 18. Taxa de mortalidade (%) da artémia exposta a Abate (concentrações agrupadas). As barras representam a média ± SE. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as condições testadas ($p < 0,001$).....	44
Figura 19. Taxa de mortalidade (%) global da artémia exposta a diferentes concentrações de Abate (µg L ⁻¹). As barras representam a média ± SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.....	45
Figura 20. Tempo de reação à presença de alimento (artémia), nos grupos de guppies controlo e expostos a DDT (concentrações agrupadas). As barras representam a média ± SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.....	45
Figura 21. Comparação entre o tempo de reação à presença de alimento (artémia) nos grupos de guppies expostos a DDT (50 e 500 ng L ⁻¹). As barras representam a média ± SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.....	46
Figura 22. Comparação entre o tempo de reação do guppy à presença de alimento (artémia) na situação CTR comparativamente à exposição a DDT (concentrações agrupadas), durante 3 tempos distintos designadamente 1 h, 24 h e 48 h. As barras representam a média ± SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.....	46
Figura 23. Tempo total que os guppies demoram a alimentar-se no grupo controlo e no exposto a DDT (concentrações agrupadas). As barras representam a média ± SE e letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,01$).	47
Figura 24. Tempo global que dois grupos de guppies expostos a DDT (50 e 500 ng L ⁻¹) demoram a alimentar-se. As barras representam a média ± SE e letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).	47
Figura 25. Comparação entre o tempo que os animais demoraram a alimentar-se na saturação controlo e após exposição a DDT (concentrações agrupadas), durante 3 tempos distintos (1 h, 24 h e 48 h). As barras representam a média ± SE e letras distintas indicam diferenças significativas entre grupos ($p < 0,05$).....	48
Figura 26. Tempo de reação à presença de alimento (artémia) no grupo de controlo (CTR) e após exposição a Spinosade (concentrações agrupadas). As barras representam a média ± SE e letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).....	48

Figura 27. Tempo de reação à presença de alimento (artémia) nos grupos de guppies expostos a Spinosade (5 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$). As barras apresentam a média \pm SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.....	49
Figura 28. Tempo de reação à presença de alimento (artémia) na situação de controlo (CRT) e após exposição a Spinosade (concentrações agrupadas), durante 3 tempos distintos (1 h, 24 h e 48 h). As barras representam a média \pm SE e letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos ($p < 0,05$).....	49
Figura 29. Tempo total de alimentação dos guppies na situação de controlo (CRT) e após a exposição a Spinosade. As barras representam a média \pm SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.....	50
Figura 30. Tempo global que dois grupos de guppies expostos a Spinosade (5 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) demoram a alimentar-se. As barras representam a média \pm SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.....	50
Figura 31. Tempo que os animais consumiram para se alimentarem, no grupo controlo e após exposição a Spinosade (concentrações agrupadas) durante 3 tempos (1 h, 24 h e 48 h). As barras mostram a média \pm SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.....	51
Figura 32. Tempo de reação à presença de alimento (artémia) nos grupos de guppies controlo e expostos a Spinosade (concentrações agrupadas). As barras mostram a média \pm SE e letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,001$).....	51
Figura 33. Tempo global que dois grupos de guppies expostos a Abate (10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) demoram a reagir ao alimento. As barras representam a média \pm SE.....	52
Figura 34. Tempo de reação à presença de alimento (artémia) na situação de controlo comparativamente ao grupo de guppies expostos a Abate, durante 3 tempos distintos (1 h, 24 h e 48 h). As barras representam a média \pm SE e letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos ($p < 0,01$).....	52
Figura 35. Tempo que os guppies demoram a alimentar-se na situação de controlo (CRT) e após a exposição a Abate (concentrações agrupadas). As barras representam a média \pm SE e letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,001$).....	53
Figura 36. Tempo global que dois grupos de guppies expostos a Abate (10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) demoram a alimentar-se. As barras representam a média \pm SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.....	53

Figura 37. Tempo que os animais despenderam a alimentar-se na situação de controlo (CRT) e após a exposição a Abate (concentrações agrupadas), durante 3 tempos distintos (1 h, 24 h e 48 h). As barras representam a média \pm SE e letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$)...... 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Toxicidade do DDT (standard p,p'-DDT).....	23
Tabela 2. Toxicidade do Spinosade.....	24
Tabela 3. Toxicidade do Abate.....	25
Tabela 4. Esquematização da contagem do número de larvas vivas (V) e mortas (M) em cada placa para cálculo da percentagem de mortalidade.....	38

RESUMO

A malária é uma doença causada por um parasita do género *Plasmodium* que, apesar de ser conhecida desde a antiguidade, ainda continua a ser uma das doenças parasíticas causadora de mais óbitos a nível mundial. Como o plasmódio é transmitido ao Homem através da picada de fêmeas de mosquito *Anopheles* spp., têm aparecido e sido usados vários inseticidas, nomeadamente o DDT, com o objetivo de aniquilar o vetor da transmissão desta doença. No entanto, ao se utilizarem indiscriminadamente inseticidas, tem-se observado o aparecimento de animais resistentes ao seu modo de ação, que continuam assim a disseminar a doença.

Portanto, recentemente concluiu-se que a estratégia de combate à malária recorrendo apenas à utilização de inseticidas não parece ser a mais indicada. Como tal, surgiu a ideia de aliar a esta outra estratégia, a de controlar biologicamente a propagação da doença. Neste sentido o uso de peixes larvívoros parece uma boa opção pois enquanto os inseticidas aniquilam larvas e mosquitos adultos os peixes alimentam-se das larvas resistentes evitando assim o aparecimento de novos indivíduos portadores da doença. Contudo, para que esta estratégia se torne viável é necessário investigar qual o inseticida que se apresenta menos deletério para o ambiente, e com menos impacto sobre os peixes, que se pretendem manter em condições de saúde ótimas de modo a manterem inalterado o seu apetite.

Assim, nesta dissertação, foram estudados quais os impactos de três pesticidas em uso no combate ao vetor da malária – DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), Spinosade e Abate - sobre larvas de artémia salina (*Artemia salina*), que se sabe apresentam uma resistência a pesticidas semelhante à das larvas de mosquito mas que ao contrário destas são mais fáceis de manter. Nesta etapa, observou-se que estes organismos modelo apresentaram, para o DDT e o Spinosade, taxas de mortalidade semelhantes (de aproximadamente 40% a 50%) enquanto o Abate não apresentou mortalidade diferente da observada nos grupos controlo.

Em outra fase do trabalho expuseram-se guppies (*Poecilia reticulata*), que são peixes larvívoros, a concentrações elevadas destes três pesticidas e foram registados vários parâmetros capazes de indicar qual o seu impacto sobre a capacidade destes animais se alimentarem de larvas. Nesta situação, os náuplios de artémia mais uma vez simularam larvas de mosquito. Estes ensaios revelaram que enquanto o DDT e o Abate provocavam uma redução na capacidade dos peixes se alimentarem, diminuindo o tempo até à saciação. Já o Spinosade, manter os peixes em condições análogas ao controlo quanto a esse parâmetro e ainda diminuiu o tempo de reação à presa.

Em suma, este estudo permite inferir que o Spinosade parece poder vir a ser simultaneamente associado à capacidade larvívora do guppy, constituindo esta “união” uma estratégia a explorar para maior eficiência no controlo da propagação da malária.

ABSTRACT

Malaria is a disease caused by a parasite that belongs to the genus *Plasmodium*, despite being known since antiquity, still remains one of the parasitic diseases that cause more deaths in the world. As the plasmodium is transmitted to humans through the bite of females mosquito of *Anopheles* sp. it have appeared and been used several pesticides, including DDT, with the aim of annihilating the vector of transmission of this disease. However, when using insecticides extensively, we have seen the emergence of resistant animals to their mode of action, which thus continue to spread the disease.

Therefore, the combat of malaria using only insecticides have been regarded as inadequate and other strategies combining the biological control and chemical control have been implemented. In this sense, the use of larvivorous fish for mosquito control seems to be a good option because fish feed the larvae (including those that are resistant to insecticides) and thus can reduce the appearance of new adults. However, for this strategy to be viable it is necessary to investigate what kind of insecticide(s) are less harmful to the environment, and particularly that may have less impact on the fish welfare in order to maintain unchanged the larvivorous fish appetite.

Thus, in this dissertation it is exploited the concept of blending pesticides with an established biological agent. We start by investigating the impact of three pesticides – DDT, Spinosad and Abate – on the larvae of brine shrimp (*Artemia salina*), which is known to present a similar resistance to pesticides when compared with mosquito larvae, but unlike these are easier to maintain under experimental conditions. In this step, it was noted that these model organisms presented similar mortality rates (from about 40% to 50%) to DDT (dichloro-diphenyl-trichloroethane) and Spinosad, while the Abate pesticide showed no significant differences when compared to control group.

In a posterior stage of the investigation, guppies (*Poecilia reticulata*), which are larvivorous fish, were exposed to high concentrations of these pesticides and selected parameters that are indicators of the ability of these animals to feed larvae were analysed. In this situation, brine shrimp nauplii once again simulated the mosquito larvae. These tests revealed that DDT and Abate caused a reduction in the fish capacity to feed, by decreasing the time they took up to satiation. On the other hand, the Spinosad kept the fish in seemingly similar conditions in relation to the control animals, at least in what concerns the total time of predation of the nauplii, decreasing the reaction time.

Thus, this study allowed us to conclude that combination of larvivorous fish with pesticides, particularly with Spinosad, should be further evaluated under several scenarios and expanded to conclude their efficiency in the control programs of malaria.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A malária: Origem e vetor de transmissão da doença

A malária é uma doença infecciosa aguda muito debilitante, causada por protozoários unicelulares do género *Plasmodium* que compreendem cinco espécies de plasmódio capazes de infetarem o Homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. A espécie *P. vivax*, embora mais distribuída globalmente, uma vez que se observa existir tanto em áreas tropicais como também em algumas temperadas, é responsável por um número de mortes menor do que a *P. falciparum* que é a espécie que causa a malária mais grave (Godfray 2013). Estima-se que atualmente a malária infeta cerca de 219 milhões de pessoas a cada ano, o que por outras palavras representa que a cada minuto em todo o mundo morrem pessoas devido a esta doença. Além disso, importa salientar que 90% das mortes são em África subsariana (**Figura 1**), fator que tem um importante contributo no pobre crescimento e desenvolvimento deste continente.

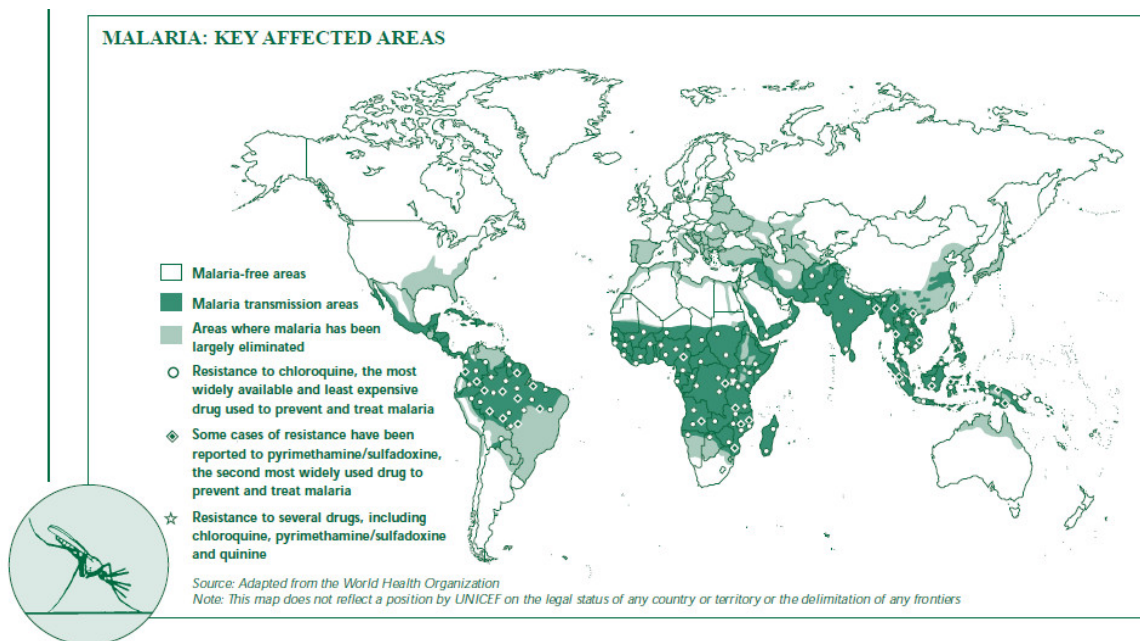


Figura 1. Mapa mundial ilustrando os focos de prevalência da malária (UNICEF 2010).

Esta doença, que ocorre maioritariamente em países com clima quente e húmido (UNICEF 2010), transmite-se entre indivíduos infetados e saudáveis através da picada da fêmea de um mosquito do género *Anopheles*, que é o principal vetor do agente etiológico da malária. Portanto, a transmissão desta doença está intimamente ligada

não só ao ciclo de vida do *Plasmodium* (**Figura 2**) mas também ao ciclo de vida daquele mosquito.

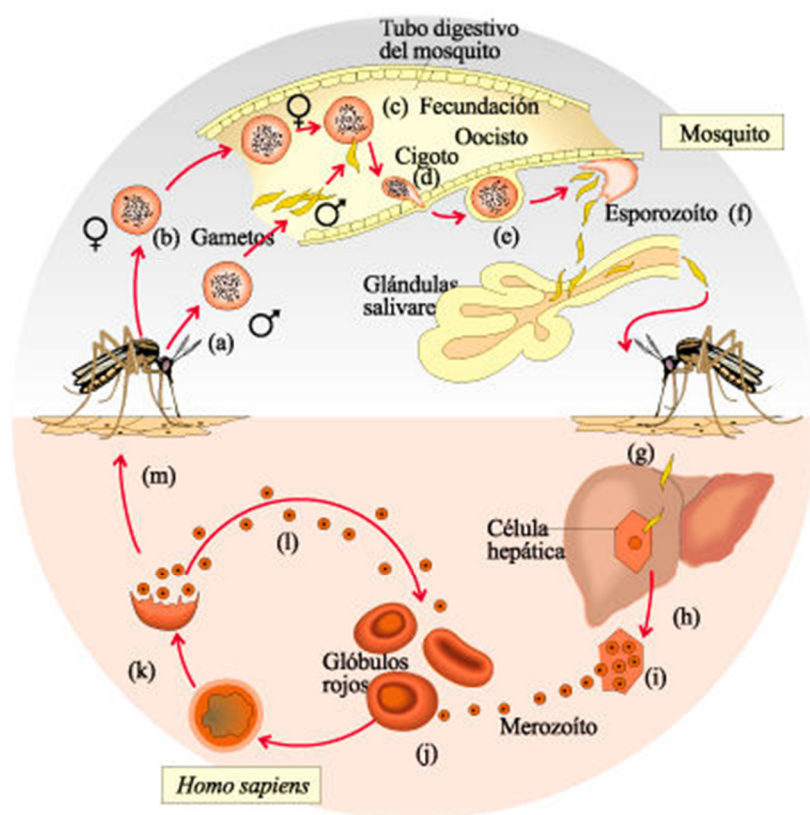


Figura 2. Ciclo de vida do plasmódio, inicialmente no mosquito anófeles e posteriormente no Homem (guineveremedicina.blogspot.pt/2012/07/o-fim-da-malaria-drauzio-varella.html, acesso em 29 de setembro 2016).

Relativamente ao ciclo de vida do plasmódio este pode reproduzir-se no tubo digestivo do mosquito de onde migra para as glândulas salivares do mesmo (**Figura 2**). A partir daqui, e como as fêmeas de mosquito se alimentam de sangue, os plasmódios na fase de esporozoíto podem passar das glândulas salivares do inseto hematófago para a corrente sanguínea humana, através da qual atingem o fígado. Aí, invadem os hepatócitos onde se transformam em esquizontes, maiores e multinucleares, e se reproduzem assexuadamente originando merozoítos. Estas novas formas invadem os eritrócitos, onde permanecem não detetados pelo sistema imunitário, e se voltam a reproduzir assexuadamente originando a sua lise, o que proporciona a saída de mais merozoítos e substâncias tóxicas para a corrente sanguínea. Só neste momento é que o sistema imune produz citocinas pelos leucócitos, como a IL-1, que produz febre, tremores, e mal-estar no organismo hospedeiro.

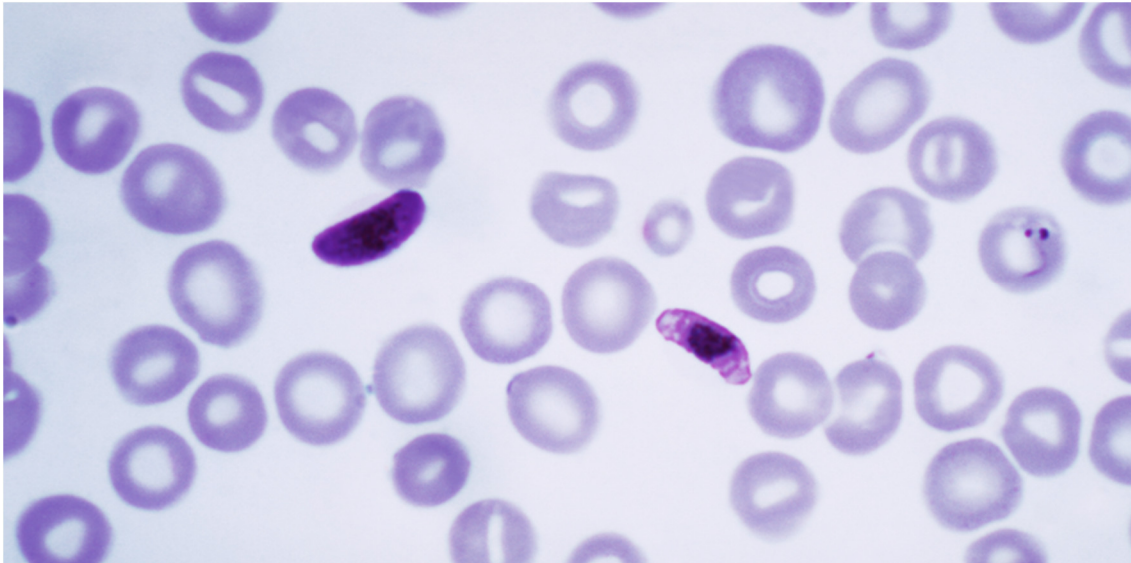


Figura 3. Esfregaço de sangue humano infectado com o parasita da malária, *P. falciparum*. As formas escuras correspondem a gâmetas que, no mosquito, originam esporozoítos ([upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fc/Plasmodium_falciparum_01. png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fc/Plasmodium_falciparum_01.png), acesso em 29 de setembro 2016).

Entretanto, alguns merozoítos sofrem meiose, sendo que estas novas formas correspondem a gâmetas femininos e masculinos, designados gametócitos (**Figura 3**), que são ingeridos por novos mosquitos que piquem o hospedeiro humano infectado. No tubo digestivo destes novos mosquitos os gâmetas fundem-se (reprodução sexuada), originando esporozoítos capazes de infectar novas vítimas. Neste caso, as crianças e as mulheres grávidas são os principais alvos mortais desta devastadora doença visto serem os que apresentam sistemas imunes mais debilitados (Crompton et al., 2014).

O tratamento da malária, nas zonas afetadas por esta epidemia, tem sido limitado, entre outros, pela dificuldade em armazenar e distribuir os medicamentos, bem como pelo desenvolvimento da resistência às drogas utilizadas para este efeito (Choen et al., 2012; Sevene et al., 2010).

1.2. Ciclo de vida do mosquito *Anopheles* e relação com o meio aquático

Tal como referido anteriormente, o vetor da malária é a fêmea do mosquito anófeles, que prospera em ambientes quentes e húmidos ricos em charcos de água, que são perfeitos para a sua proliferação. Este animal deposita os seus ovos numa vasta gama de habitats que incluem: água doce, pântanos de água salgada, campos de arroz, bordas dos rios, poças formadas pela chuva, entre outros. Este tipo de ambi-

entes é muitas vezes associado a locais cujas condições de higiene e cuidados de saúde são deficientes (UNICEF 2010; Walshe et al. 2013). Por isso, a abundância de mosquitos adultos depende de uma variedade de fatores que incluem o número e o tamanho adequado dos sítios de postura de ovos, a temperatura, os padrões de chuva e a disponibilidade de fontes de sangue (Walshe et al. 2013).

Relativamente ao seu ciclo de vida, este compreende quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (**Figura 4**). Os ovos são depositados em águas estagnadas ou em águas de fluxo lento e são muito pequenos (2-5 mm de largura), podendo ser vistos como pequenas manchas pretas na superfície da água. Dois ou três dias após a ovoposição, a larva do mosquito sai de cada ovo e alimenta-se de organismos microscópicos (fitoplâncton e zooplâncton) até se tornar uma pupa. Posteriormente a pupa origina um mosquito adulto que acaba por voar.

Nesta fase, o mosquito torna-se independente do meio aquático até atingir a sua maturidade sexual, i.e., estar pronto a depositar mais ovos (Ramirez, Garver et al. 2009). Dependendo da temperatura da água, todo este processo pode decorrer entre 7-14 dias (UNICEF 2010).

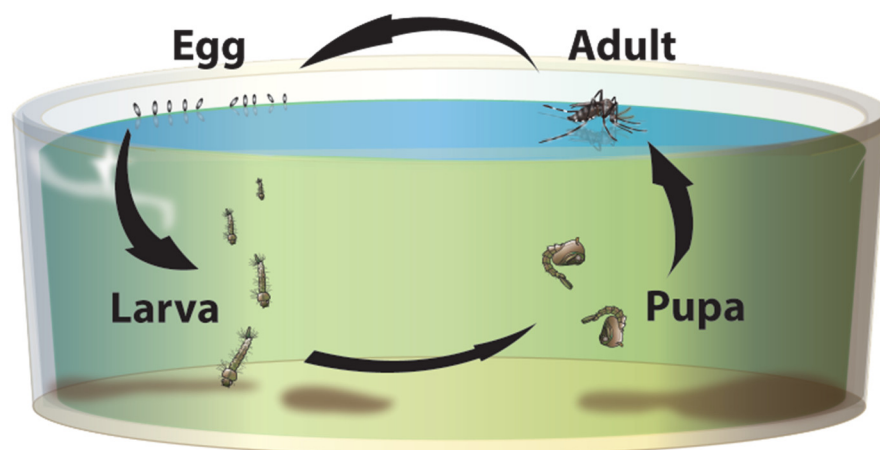


Figura 4. Ciclo de vida do mosquito *Anopheles* spp.; o potencial portador do parasita da malária (www.ocvector.org/InvasiveMosquitoes.html, acesso em 26 de setembro 2016).

Através de medidas de controlo do vetor da malária esta doença foi erradicada dos Estados Unidos, do Sul e Leste da Europa, da bacia do Mediterrâneo, sendo que os casos de incidência nos principais focos da doença foram diminuídos na Índia e no Sri Lanka. Porém, a transmissão da malária permanece descontrolada tanto em África como em algumas partes da Ásia e América Latina (Gratz 1999; Keiser, Keizer et al.

2004). Tendo em conta o número de mortes humanas que causa, a espécie de mosquito *Anopheles gambiae* é considerado por muitos cientistas como um dos animais mais perigosos na Terra (Vogel 2002).

1.3. Gestão ambiental no controlo do vetor da malária

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o controlo dos vetores de doenças envolve o planeamento, organização, execução e monitorização de atividades que afetam os fatores ambientais ou a sua interação com o Homem.

Pretende-se então promover (1) modificações ambientais (normalmente envolvem mudanças permanentes do habitat natural) ou (2) realizar manipulações ambientais pontuais capazes de afetar negativamente a reprodução do vetor da doença (Lindsay et al. 2004; Keizer et al. 2005; Walker and Lynch 2007; Ramirez et al. 2009).

Portanto, a primeira fase da gestão ambiental deve ser a identificação de todos os potenciais locais de desenvolvimento do vetor da doença identificando qual o melhor momento para haver a intervenção humana. De seguida é também fulcral conhecer as flutuações sazonais da transmissão da doença (Lindsay et al. 2004; Keiser et al. 2005).

Uma vez que o ciclo de vida do mosquito transmissor da malária é altamente dependente do meio aquático, as estratégias de controlo desta doença têm-se focado em boa parte na limitação da população de mosquitos, por exemplo através da drenagem de zonas pantanosas e pelo uso de peixes larvívoros com o objetivo de diminuir a densidade/número de larvas e pupas (Shiff 2002; Walker and Lynch 2007).

Estas estratégias tiveram sucesso em locais como Itália (Roma), Israel, Índia, Brasil e Zâmbia (Utzinger et al. 2001; Killeen et al. 2002), havendo uma correlação positiva entre as práticas da gestão ambiental e o controlo da disseminação da malária (Dickinson et al. 2010).

Porém, alguns comportamentos podem prejudicar e mesmo colocar em causa o sucesso destas ações, nomeadamente a desflorestação, acumulação de populações humanas em áreas restritas, urbanização e aumento desenfreado de indústrias sem o respetivo acompanhamento de infraestruturas sanitárias. Estas ações que potenciam a

propagação da malária uma vez que estas contribuem para a criação de novos locais onde é possível o crescimento de mosquitos (Gratz 1999).

1.3.1. Vantagens e desvantagens da gestão ambiental

Uma boa gestão ambiental permite diminuir a utilização de inseticidas, que representam elevados custos não só para o ambiente, como também para as comunidades locais. Por isto, aquela gestão é considerada uma forma não tóxica e sustentável de combater a malária (Lindsay et al. 2004; Teklehaimanot et al. 2005).

No entanto, a efetividade da gestão ambiental depende de diversos fatores, tais como condições ecológicas, geológicas, climáticas e sociais pelo que o maior entrave à sua aplicação relaciona-se com o impacto que esta poderá ter sobre o equilíbrio ecológico. É importante notar que a gestão ambiental terá inevitavelmente diferentes níveis de eficácia em diferentes localizações. Por exemplo, a limpeza do ambiente circundante e a drenagem da água estagnada poderá ser relativamente fácil de implementar em áreas montanhosas, mas extremamente complexa e dispendiosa em áreas planas (Randell et al. 2010). Além disto, a drenagem de pantanais não pode ser realizada em locais de áreas protegidas e a eliminação de poças/charcos de água que se formam naturalmente durante a época de chuvas poderá ser impraticável (Lacey & Lacey 1990; Lindsay et al. 2004; Ramirez et al. 2009). Como nos últimos 100 anos muitas têm sido as ações deste tipo, ocorreu como consequência a destruição de diversos habitats aquáticos, a extinção de cerca de 800 espécies de água doce e até um aumento de focos de poluição nesses locais (Lindsay et al. 2004).

Portanto, a utilização de modificações ambientais, embora reduzam de forma eficiente os locais de reprodução dos mosquitos depende da existência de infraestruturas, dispendiosas a longo prazo, que envolvem a sua regular manutenção (Caldes de Castro et al. 2004).

1.4. Controlo químico do vetor da malária

Muitos têm sido os pesticidas utilizados no controlo da malária. Entre estes destacam-se compostos, tais como, verde-paris, cloreto de mercúrio, naftalina, fenóis, cresóis, sulfato de nicotina e subprodutos de petróleo (DeLorenzo et al. 2001; Raghavendra and Subbarao 2002). O verde-paris (aceto arsenito de cobre) e óleo de petró-

leo, por exemplo, foram aplicados para impedir o crescimento da larva do mosquito anófeles (Kamareddine 2012).

Na Ásia a utilização de mosquiteiros impregnados com inseticidas piritoides tiveram um grande impacto na redução da incidência dos casos da malária. Esta metodologia foi depois alargada a outros locais do Mundo. Porém, a eficiência desta abordagem depende da larga distribuição (e substituição) de mosquiteiros pelas populações e da disponibilização de químicos a baixo custo (DeLorenzo et al. 2001).

No século XX, o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) foi o primeiro inseticida orgânico sintético utilizado para combater mosquitos potencialmente infetados com a malária. Este pesticida passou a ser utilizado como primeiro recurso em muitos países ditos “em desenvolvimento”, com elevadas prevalências da doença (**Figura 1**), tendo sido deixado de parte as estratégias que tinham em vista o combate do vetor em estádios de desenvolvimento mais precoces, tais, como os estádios de ovo e larva (DeLorenzo et al. 2001; Kamareddine 2012).

De facto, inicialmente a elevada efetividade do DDT despoletou a falsa esperança de que seria possível exterminar o vetor desta doença. Porém, o surgimento de mosquitos resistentes a este pesticida incentivou a que muitos países, nomeadamente os Europeus, descartassem a aplicação de DDT. Assim, este inseticida passou a ser considerado por parte das instituições sanitárias como deletério devido ao seu elevado impacto ecológico (DeLorenzo et al. 2001). Além disto, o DDT foi mais tarde associado a doenças graves como cancro da mama, e pâncreas podendo afetar ainda o funcionamento do fígado, rins, sistema nervoso, imunitário e reprodutivo. Também, se observou que o DDT se comportava como poluente para a água (DeLorenzo et al. 2001), tendo potencial para ser extremamente tóxico para animais aquáticos, nomeadamente para peixes (Kamareddine 2012).

Apesar disto, e recorrendo a inseticidas mais modernos, o controlo químico tem a vantagem de ser aplicado diretamente nos locais de desenvolvimento das larvas de anófeles, além de possibilitar a conciliação com outros métodos de combate à malária, como o controlo biológico (Walker and Lynch 2007). A utilização de pesticidas é também considerada por alguns autores como a alternativa mais económica no combate à malária (Raghavendra and Subbarao 2002; Lindsay et al. 2004).

No entanto, a principal desvantagem do controle químico é não ser seletivo e acabar por conduzir ao aparecimento de resistências aos pesticidas por parte dos organismos alvo (Raghavendra and Subbarao 2002; Lindsay et al. 2004; Bhattacharjee et al. 2008).

1.4.1. Propriedades físicas, químicas e tóxicas do DDT

O DDT é um pesticida organoclorado, que tem sido utilizado extensivamente em todo o Mundo como inseticida. Relativamente às suas propriedades físicas e químicas, apresenta ponto de fusão a 108° C e baixa solubilidade em água (0,025 mg/L a 25 °C). No entanto, e tal como indica o valor do logaritmo do coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$), de 6,5 (OECD), é muito solúvel em etanol e acetona.

Apesar de pouco solúvel em água o DDT pode ser transportado para este habitat através da erosão do solo, pelo movimento de partículas em suspensão ou até pelas chuvas que o transportam volatilizado na atmosfera. Além disso, uma vez que este pesticida apresenta baixa solubilidade, a coluna da água serve de veículo, que rapidamente o transfere para a fração orgânica, na qual se encontram incluídos os organismos aquáticos (Bischoff, Gould et al. 1985). Por este motivo o DDT é considerado um poluente orgânico persistente (POP) conduzindo por um lado à contaminação do meio aquático e à sua bioacumulação/bioamplificação ao longo da cadeia trófica, assim como ao aumento da resistência dos mosquitos a este composto (Walker and Lynch 2007).

A título de exemplo, o DDT tem sido detetado em massas de água, tal como o Lago Burullus (Egito), em concentrações que variaram entre 0,07 ng L⁻¹ e 882 ng L⁻¹, dependendo da estação do ano (Said, El Moselhy et al. 2008). Também se verificou que este pesticida exerce um impacto muito negativo sobre os organismos aquáticos, nomeadamente sobre organismos copépodes (**Tabela 1**), uma vez que o aumento da concentração de DDT na água foi associado à diminuição da taxa de filtração e respiração do copépode *Sinocalanus tenellus*, assim como com uma diminuição do diâmetro dos seus ovos e da taxa de sobrevivência destes organismos (Xu and Liu 2014).

Tabela 1. Toxicidade do DDT (standard p,p'-DDT).

Espécie	Teste	Concentrações	Referências
Dáfnia (<i>Daphnia magna</i>)	EC ₅₀ 48 h	5,0 µg L ⁻¹	(IUPAC 2015)
	LC ₅₀ 14 dias	0,7 µg L ⁻¹	(U.S. National Library of Medicine 2016)*
Copépode (<i>S. tenellus</i>)	LC ₅₀ 48 h	5,4 µg L ⁻¹	(Xu e Liu 2014)
	LC ₅₀ 96 h	2,5 µg L ⁻¹	
Artémia (<i>A. salina</i>)	LC ₅₀ 24 h	0,15 – 0,57 µg L ⁻¹	(Kirdsook 1993)
		43,0 mg L ⁻¹	
	LC ₅₀ 24 h	17,0 mg L ⁻¹	(Sánchez-Fortún et al. 1995)
		16,4 mg L ⁻¹	
	LC ₅₀ 48 h	11,5 µg L ⁻¹	(Patin 1982)

*(<https://webwisser.nlm.nih.gov/getSubstanceData.do?substanceId=2&displaySubstanceName=p-p-DDT&STCCID=&UNNAID=&selectedDataMenuItemID=79>, acesso em 29 de setembro 2016.)

1.4.2. Propriedades físicas, químicas e tóxicas do Spinosade

O Spinosade (mistura de Spinosina A e D) é um pesticida que deriva de compostos químicos encontrados na espécie de bactérias *Saccharopolyspora spinosa*). É um líquido, apresentando ponto de ebulição a 100° C. Dispersa-se em água sendo a sua solubilidade dependente do pH, ex. a pH 7 a solubilidade de Spinosine A é 235 mg/L e D é de 0,332 mg/L. O valor de log K_{ow} também é dependente do pH sendo por ex. a pH 7 de 4,01 para Spinosine A e de 4,53 para D [http://www.parapro.com/documents/spinosad_technical_bulletin.pdf, acesso em 26 de setembro 2016].

O Spinosade é um inseticida neurotóxico desenvolvido inicialmente para o controle de pragas da agricultura. Trata-se de um pesticida derivado de um produto natural, uma vez que é um metabolito secundário da fermentação aeróbica de nutrientes pela ação de duas bactérias do solo, designadamente do género *Saccharopolyspora*. Deste processo fermentativo ocorre a formação de dois isómeros, Spinosade A e Spinosade D, sendo que a forma A é a dominante e mais ativa (Thompson et al. 2000; Kirst 2010; Lumaret et al. 2012).

Este pesticida é avaliado como um composto toxicológico de reduzido risco e espectro, comparado com os inseticidas sintéticos (Williams et al. 2003). Assim, apresenta baixa toxicidade para mamíferos e aves, e uma toxicidade moderada para os organismos aquáticos (**Tabela 2**) (Thompson et al. 2000).

De facto, este pesticida tem sido detetado em algumas massas de água do México em concentrações na gama dos 76,3 e 202 mg L⁻¹ (Fan, Segawa et al. 2008). Apesar destas elevadas concentrações, o Spinosade degrada-se rapidamente em 3 - 7 dias após a aplicação, apresentando pouca toxicidade residual (Williams, Valle et al. 2003). A degradação do Spinosade no meio ambiente dá-se fundamentalmente por mecanismos de fotodegradação e de biotransformação por microrganismos, estes maioritariamente presentes no solo (Kollman 2003). Estes fatores, nomeadamente a baixa toxicidade para os mamíferos e o seu potencial larvívoro têm sido fatores fulcrais para o forte incentivo da substituição dos pesticidas sintéticos organofosforados pelo Spinosade em áreas de combate ao mosquito vetor da malária (Bahgat et al. 2007; Hertlein et al. 2010; Marina et al. 2012).

Tabela 2. Toxicidade do Spinosade.

Espécie	Teste	Resultado	Referências
Dáfnia (<i>D. magna</i>)	LC ₅₀ 48 h	92,7 mg L ⁻¹	
Camarão fantasma (<i>Palaemon pandaliformis</i>)	LC ₅₀ 96 h	> 9,8 mg L ⁻¹	
Carpa (<i>Cyprinus</i> sp.)	LC ₅₀ 96 h	5,0 mg L ⁻¹	(Thompson et al. 2000)
“Blugill” (<i>Lepomis macrochirus</i>)	LC ₅₀ 96 h	5,9 mg L ⁻¹	
“Sheepshead minnow” (<i>Cyprinodon variegatus</i>)	LC ₅₀ 96 h	7,9 mg L ⁻¹	
Truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	LC ₅₀ 96 h	30 mg L ⁻¹	
Artémia (<i>A. salina</i>)	LC ₅₀ 24 h	0,011 mg L ⁻¹	(Marten et al. 1993)

1.4.3. Propriedades físicas, químicas e tóxicas do Abate

Desde 1965 que o Abate, também conhecido por Temefos, tem sido usado como substituto do DDT. O Abate é um inseticida organofosforado que quando utilizado de acordo com o rótulo tem poucos ou nenhuns efeitos prejudiciais sobre organismos não-alvo (Connelly and Carlson 2009). De facto, o Abate é um dos pesticidas organofosfatos menos tóxicos para os mamíferos, sendo considerado um pesticida de baixa persistência no ambiente (**Tabela 3**). Por isso, ele pode ser aplicado diretamente na água sem prejudicar a potabilidade desta (Walker and Lynch 2007; Connelly and Carlson 2009). Este pesticida tem sido utilizado no combate à malária em países como as Maurícias e Omã (Gopaul 1995; Parvez and Al-Wahaibi 2003).

Relativamente às suas propriedades físicas e químicas, o Abate apresenta ponto de fusão a 30° C e baixa solubilidade em água (0,03 mg/L a 25 °C). No entanto, e tal como indica o seu log K_{ow} de 4,91 a 25 °C, forma uma emulsão em água (WHO 2011).

Tabela 3. Toxicidade do Abate.

Espécie	Teste	Resultado	Referências
Dáfnia (<i>D. magna</i>)	EC ₅₀ 48 h	0,15 µg L ⁻¹	(Abe, Coleone et al. 2014)
	NOEC	6,2 ng L ⁻¹	
	LOEC	12,5 ng L ⁻¹	
Copépode (<i>Macrocyclops albidus</i>)	LC ₅₀	0,011 mg L ⁻¹	(Marten, Che et al. 1993)

No meio ambiente, nomeadamente em alguns rios e lagos, foi detetado estar em concentrações que variam entre 0,025 e 0,5 mg L⁻¹ (Edward and Sogbesan 2007).

1.5. Controlo biológico do vetor da malária

O controlo biológico refere-se à introdução ou manipulação de organismos que ajudam a regular (diminuir) a população de anófeles através de fenómenos como a predação, parasitismo e competição. Os organismos reconhecidos como tendo o maior potencial para este efeito são peixes larvívoros e bactérias patogénicas que atacam as larvas de mosquito (Walker 2002; Walker and Lynch 2007). Por isso, estes são modos de controlo larval, que na prática significa uma redução do sucesso das popula-

ções de larvas e que indiretamente afetam a população de mosquitos (Keiser et al. 2004). Apesar das inúmeras tentativas de controlo biológico do vetor da malária, diz-se que esta área está ainda na “sua infância”, havendo potencial para evoluções no uso desta estratégia, incluso com o recurso a diversas espécies promissoras, que, além de bactérias e peixes, incluem fungos, vírus e nematodes (Kamareddine 2012).

1.5.1. Utilização de peixes larvívoros

Os peixes larvívoros são predadores excepcionais de larvas de mosquitos podendo constituir uma ferramenta de combate à malária, como aliás é usado desde há várias décadas. Neste caso, a família dos ciprinodontídeos (Cyprinodontidae) é a mais importante para este fim sendo que, nos últimos 100 anos, tem sido amplamente utilizada. Para além desta família, a introdução do peixe-mosquito (*Gambusia affinis*) e do guppy (*Poecilia reticulata*) têm ajudado ao combate à malária em vários países, como o Havai, a Espanha, Itália e Índia (Rupp 1996; Chandra et al. 2008).

Também na China a introdução de carpas (*C. carpio*) nos campos de arroz tem sido frequente e este facto tem sido associado ao fenómeno da redução dos casos de malária. Complementarmente, esta metodologia revelou-se extremamente rentável uma vez que favoreceu a produção de arroz (foram documentadas melhorias na ordem dos 52%) (Wu et al. 1991).

Na Somália, a introdução da tilápia (*Oreochromis spilurus*) em lagos provocou uma diminuição de 50% da densidade larval em apenas 1 mês. Os peixes larvívoros representam assim uma forma promissora de controlar a malária, particularmente em áreas urbanas (Mohamed 2003).

O fator determinante da eficácia de peixes larvívoros é a sustentabilidade das espécies de peixes nas massas de água onde a larva do vetor se desenvolve. Por isso, tem-se tentado recorrer à utilização de espécies nativas de cada habitat (Keiser et al. 2004).

A utilização deste método envolve uma análise prévia da sua efetividade, que depende de diversos fatores. O primeiro relaciona-se com a quantidade de larvas que cada peixe consegue comer na coluna de água e o segundo depende das condições ambientais, nomeadamente da densidade de vegetação, uma vez que quanto mais densa for menor será a capacidade de predação dos peixes. Um terceiro diz respeito à

compatibilidade da espécie com o meio onde será inserido. Este último aspeto poderá ser mais efetivamente contornado se forem utilizadas espécies endémicas (Lacey and Lacey 1990; Walker 2002).

Porém, como as larvas são exclusivamente aquáticas, esta forma de controlo sobre as populações de larvas de mosquito depende da capacidade de se introduzirem peixes larvívoros nas massas de água. Assim, se o número de sítios de reprodução do mosquito forem muitos, ocuparem áreas muito vastas, de difícil acesso ou de duração efémera este método pode ser ineficiente. Por isso, este tipo de abordagem parece ideal para ser aplicado em áreas urbanas, onde existe uma grande densidade humana em relação ao número de berçários (Keiser et al. 2004).

1.5.2. O guppy (*Poecilia reticulata*) como agente de controlo biológico

Alguns dos fatores que determinam a seleção de animais aquáticos, em particular de peixes larvívoros, para controlar biologicamente mosquitos em diversos ecossistemas relacionam-se com os seguintes aspetos (Chandra et al. 2008):

- a. Preferência destes animais por larvas de mosquitos em detrimento de outros alimentos existentes à superfície da água;
- b. Reduzidas dimensões, o que lhes permite terem mais fácil acesso ao alimento localizado em pequenas faixas entre a vegetação;
- c. Elevada tolerância tanto à poluição, como a variações de salinidade, temperatura e transporte;
- d. Serem indígenas da região que se pretende controlar.

De entre as várias espécies que apresentam estas características, as das famílias Poeciliidae e Cyprinodontidae têm sido as mais exploradas, como são exemplo os peixes dos géneros *Poecilia* (viz., *P. reticulata*) e *Gambusia* (viz., *G. affinis*); no último caso o nome vulgar o peixe é até conhecido simplesmente como “peixe-mosquito”. No caso de ambientes mais poluídos, como o peixe-mosquito não é tão tolerante à poluição como o guppy, este último acaba por ser o preferido (Chandra et al. 2008).

Neste caso, o guppy (por vezes grafado como gupi, gúpi ou ainda gupie), originário da América do Sul destaca-se pela sua ampla distribuição geográfica, facilidade de reprodução, nítido dimorfismo sexual e resistência a condições de baixa oxigenação, tornando-os ideais como método do controlo da malária (**Figura 5**) (Pereira e Oli-

veira 2014). De facto, o guppy tem sido utilizado desde o início de 1900 no combate à malária em várias zonas geográficas (Welcomme 1992), como por exemplo na Índia devido ao aumento da resistência dos mosquitos a inseticidas (Chandra et al. 2008). Com esta medida, que se revelou mais barata e com menor prejuízo para o ambiente, houve uma redução significativa nos casos de malária na Índia (Lindsay et al. 2004).

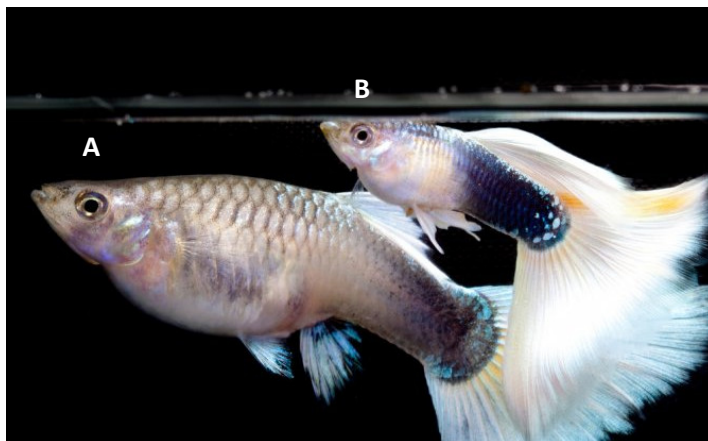


Figura 5. Exemplos de guppy fêmea (**A**) e macho (**B**) (www.practicalfishkeeping.co.uk, acesso em 29 de setembro 2016).

Foi ainda constatado que grupos compostos apenas por guppies fêmeas têm uma capacidade larvófaga duas vezes maior do que grupos de machos, uma vez que as fêmeas são maiores (≈ 31 mm vs. 20 mm) e comem em proporção maiores quantidades de larvas (Pereira e Oliveira 2014).

1.5.3. Vantagens e desvantagens do controlo biológico

Comparativamente a agentes químicos, há evidências que sustentam que os peixes larvívoros se revelaram mais efetivos, não sendo prejudiciais para os humanos, além que a sua introdução é simples (Walker and Lynch 2007). Além disso, esta abordagem é económica e não leva ao aparecimento de larvas resistentes, como sucede com a aplicação de pesticidas (Yap 1985; Walker 2002; Walker e Lynch 2007). Outra vantagem deste método é que as larvas não conseguem sair das massas de água, o que restringe logo de imediato a propagação do agente infeccioso (Killeen et al. 2002).

Apesar das vantagens, a utilização de peixes larvívoros acarreta inconvenientes. Um dos mais importantes tem a ver com o facto do uso indiscriminado de peixes conduz a prejuízos económicos e ambientais, pois pode erradicar outras espécies com requisitos ecológicos semelhantes aos das espécies introduzidas artificialmente (Rupp

1996; Lindsay et al. 2004). As mesmas características que os fazem ser bons predadores de larvas de mosquitos fazem com que se possam tornar espécies invasoras. No caso do guppy, estima-se que em $\approx 40\%$ das ocasiões onde a espécie se estabeleceu como invasora adveio da sua introdução no combate aos mosquitos (Deacon et al., 2011).

Outra limitação do método de controlo biológico pelo uso de peixes é que o seu grau de eficiência é muito variável, pois certos fatores, como a elevada vegetação, podem diminuir a capacidade de predação dos peixes (Kamareddine 2012). O grau de poluição é outro exemplo de um fator influenciador da eficácia larvófaga, havendo indicações de diminuições da taxa de consumo de larvas em águas poluídas com pouca circulação e com muita densidade de plâncton (Dua et al., 2007). Esta estratégia de controlo é também de difícil aplicação em larga escala, pelo que é efetiva sobretudo quanto em áreas relativamente restritas, fáceis de tratar e localizar (Mohamed 2003).

1.6. Ensaios toxicológicos direcionados à fauna aquática

Este tipo de ensaios toxicológicos visam avaliar os efeitos adversos que uma ou mais substâncias tóxicas exercem em organismos aquáticos. Para tal recorre-se, à utilização de um determinado organismo modelo, selecionado criteriosamente para o fim em causa, e procede-se à sua exposição ao agente de interesse, usando diferentes concentrações e/ou condições, e.g., de temperatura, pH, luminosidade, entre outros. Desta forma, pretende-se obter informações acrescidas sobre a toxicidade e biodisponibilidade dos agentes em estudo, dando-nos a informação sobre o tipo de efeitos adversos do composto em análise (Laitano and Matias 2006). Também são úteis para aferir a efetividade de determinadas espécies como bioindicadores. Este tipo de ensaios tem ainda a vantagem de gerar resultados muito rapidamente e a baixo custo.

Os ensaios toxicológicos clássicos dividem-se em ensaios de toxicidade aguda e de toxicidade crónica. Os testes agudos realizam-se em curtos períodos de tempo, que variam entre 24 h e 96 h, e geralmente têm um plano experimental simples, onde os efeitos analisados são em regra a mortalidade, embora outros efeitos indesejados, como a imobilização possam ser investigados.

Os testes crónicos implicam um período experimental mais longo e têm como principal objetivo estimar a concentrações “de segurança”. Estes estudos pretendem sobretudo determinar qual a concentração máxima que não tem efeito significativo

observado (NOEC), ou a concentração mínima que provocou um efeito significativo em relação ao controlo (LOEC). Neste caso para além da mortalidade, poderão ser observados outros efeitos, como o crescimento, locomoção, capacidade reprodutiva, parâmetros sanguíneos, lesões histopatológicas, atividades enzimáticas, entre outros. Como é difícil (na prática impossível) contabilizar todos estes efeitos, as observações estão normalmente restritas a parte desses efeitos (Lewis et al. 1994).

No sentido de minimizar diferenças interlaboratoriais e permitir a comparação efetiva de resultados obtidos, várias organizações internacionais, incluindo a “Environmental Protection Agency” (EPA) e a “Organization for Economic Cooperation and Development” (OCDE), desenvolveram protocolos padronizados para a realização de ensaios de toxicidade aguda e crónica (ASTM 2004).

Os testes de toxicidade são levados a cabo com espécies que são consideradas representativas de um dado habitat e cadeia trófica, para que as conclusões possam ser as mais abrangentes possíveis (Rand 1995).

Como se referiu anteriormente, os organismos teste necessitam de ser bem selecionados de modo a responderem às questões que se pretendem ver respondidas. Algumas das características que definem um bom organismo modelo para os testes de toxicidade prendem-se com:

- a. A abundância e disponibilidade dos organismos ao longo do ano;
- b. A facilidade de manter os organismos em cativeiro;
- c. Conhecimento científico alargado sobre a biologia, fisiologia, genética, comportamento, entre outras da espécie, de forma a permitir a correta interpretação dos resultados.

Também é importante definir o tipo de exposição que a que o organismo modelo será submetido e para isso existem 3 tipos:

- a. Estáticos – não há renovação dos meios de exposição durante todo o ensaio;
- b. Semiestáticos – os meios de exposição são renovados periodicamente (por exemplo a cada 24 h);
- c. Renovação contínua – os meios de exposição são renovadas de forma contínua.

1.6.1. A artémia (*Artemia salina*)

A artémia (**Figura 6**) é um artrópode aquático primitivo da classe Branchiopoda, mais especificamente da família Artemiidae (www.marinespecies.org), e assume particular importância tanto a nível da estabilidade dos ecossistemas naturais em que se insere, como também a nível económico para o Homem, visto ser amplamente utilizada em diversas produções aquícolas espalhadas pelo mundo (www.fao.org).



Figura 6. Exemplares de artémia (*A. salina*) (www.flickr.com/photos, acesso em 29 de setembro 2016).

Esta espécie vive essencialmente em lagos de água salgada, como por exemplo o “Great Salt Lake” na América do Norte, mas também em outros locais, como em tanques de evaporação feitos pelo Homem para obtenção de sal (Dumitrascu 2011), sendo o seu habitat normalmente caracterizado pela ausência de predadores e pela disponibilidade de alimento (Nunes et al. 2006).

Uma particularidade importante deste pequeno crustáceo é a sua elevada capacidade osmotolerante, o que lhe permite sobreviver e prosperar em ambientes hipersalinos (Naceur et al. 2008). Esta capacidade deve-se principalmente a um mecanismo fisiológico de redução da pressão osmótica da hemolinfa através da excreção de cloreto de sódio (NaCl) contra gradiente de concentração. Deste modo, a sua hemolinfa mantém-se extremamente hipotónica em relação ao meio aquático envolvente, o que lhe confere, então, resistência às variações de salinidade da água (Dumitrascu 2011).

A temperatura ambiente também assume particular importância na sobrevivência e reprodução desta espécie, sendo ótima a 24 °C, apesar de artémia estar bem adaptada a baixas temperaturas (15 °C). Os estados larvares desta espécie (náuplios) têm, por sua vez, crescimento ótimo a 28 °C e a salinidade de 35 (Dumitrascu 2011).

Dependendo de diversos fatores ambientais (temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, etc.), a artémia pode alternar entre dois métodos de reprodução sexuada a ovoviviparidade em condições ambientais favoráveis, ou a oviparidade em ambientes adversos (**Figura 7**).

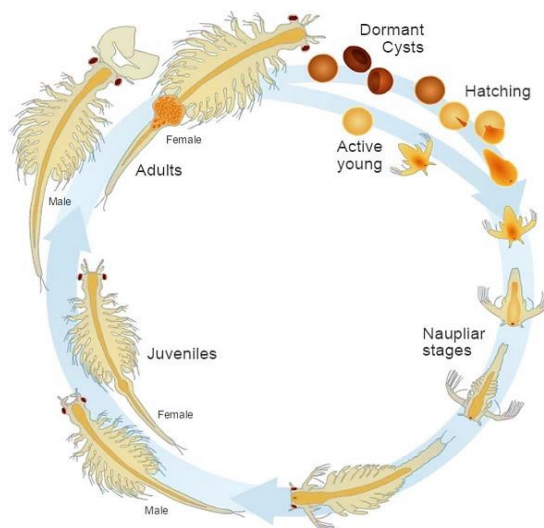


Figura 7. Ciclo de vida da artémia (www.learn.genetics.utah.edu, acesso em 26 de setembro 2016).

1.6.2. Importância ecotoxicológica da artémia

Atualmente, a artémia é uma espécie muito utilizada em aquacultura e aquarofilia, nomeadamente na alimentação de algumas espécies de peixes, crustáceos ou mesmo corais, devido ao seu baixo custo, facilidade de utilização e valor nutricional (Dumitrascu 2011). No entanto, além da sua importância na produção aquícola, a artémia também é vastamente utilizada, a nível mundial, em investigação laboratorial e em toxicologia aplicada em particular. Algumas das suas aplicações incluem a investigação de fontes tóxicas em misturas químicas e amostras ambientais, a deteção de toxinas em alimentos e produtos farmacêuticos e, ainda, estudos sobre a transferência de poluentes ao longo de cadeias tróficas (Persoone et al. 2000).

Nos ecossistemas aquáticos, os invertebrados constituem grande parte da fauna aquática, tendo um papel importante nas cadeias tróficas alimentares. A ocorrência de perturbações nestes organismos, por exposição a determinados compostos tóxicos, interfere com vários outros componentes da cadeia alimentar (Nunes et al. 2006), sendo os invertebrados organismos essenciais no estudo e análise de inúmeros ecossis-

temas. Neste contexto, a evidente necessidade de padronização de testes de toxicidade com organismos aquáticos bem como a urgência de ensaios de rotina simples e de baixo custo permitiram incrementar o surgimento de testes padronizados com algas, crustáceos e peixes para ambientes de água-doce, embora muito menos se tenha sido conseguido em relação ao ambiente marinho (Persoone et al. 2000).

Por essa razão, um teste de toxicidade a curto prazo com náuplios de artémia foi desenvolvido na Bélgica, pelo “*Artemia* Reference Center” na “State University of Ghent”. Designado por “*Artemia* Reference Center” - test (ARC-test), este teste consiste num ensaio agudo simples, económico e de rotina baseado na determinação do valor de LC_{50} - 24 h de náuplios instar II-III de artémia (**Figura 7**), podendo ser utilizado para avaliar a toxicidade de vários compostos químicos em organismos aquáticos (Vanhaecke et al. 2000).

A utilização da artémia como organismo teste em estudos de toxicidade no ambiente marinho tem como principal razão a sua disponibilidade comercial contínua na forma de cistos, a partir dos quais os estádios larvares (náuplios) são facilmente ecodados. Esta vantagem única permite resolver um dos grandes problemas dos testes ecotoxicológicos com organismos aquáticos, nomeadamente a manutenção de culturas de reserva durante determinados períodos de tempo, o que diminui possíveis custos económicos e dificuldades técnicas ou biológicas (Vanhaecke et al. 2000). Deste modo, testes de toxicidade com este pequeno invertebrado marinho podem ser realizados em qualquer local e ocasião, sendo necessárias pequenas quantidades de cistos para cada teste. Além disso, podem sempre ser obtidos grandes números de indivíduos com a mesma idade e condição fisiológica, o que é muito importante na realização dos testes toxicológicos (Vanhaecke et al. 2000).

Com a finalidade de determinar o seu grau de padronização, o ARC-test foi submetido a dois exercícios de intercalibração — um na América do Norte e outro na Europa — tendo-se concluído que era um teste de toxicidade aguda muito simples, rápido e fidedigno (Varó et al. 1997; Dvorak et al. 2012).

As principais vantagens da utilização desta espécie em ensaios de toxicidade, comparativamente com outras, são a sua grande adaptabilidade a variações de salinidade e temperatura, possuir ciclo de vida curto, alta fecundidade, ter pequenas dimensões e ser um filtrador não-seletivo (Kokkali et al. 2011; Rajabi et al. 2015; Rotini et al. 2015). Assim, embora para muitos compostos químicos a artémia se tenha revelado

menos tolerante do que seria de esperar, o seu fácil maneo e baixo custo tornou-a um bom bioindicador ambiental para águas poluídas com pesticidas (Sánchez-Fortún et al. 1995; Varó et al. 2006; Bustos-Obregon e Vargas 2010). Por fim, salienta-se a disponibilidade no mercado como alimento para peixes, em vários formatos, inclusive como náuplios recém-nascidos em solução aquosa (e.g., Ocean Nutrition).

1.7. Objetivos da dissertação

O objetivo principal desta Dissertação foi testar o conceito de até que ponto é possível associar o uso de um método de controlo biológico baseado num peixe larvívoro com a aplicação de controlo químico, com uso de pesticidas. O fundamento desta estratégia é que perante as fragilidades de cada metodologia isolada, a combinação de lógicas diferentes mas complementares será a forma que teoricamente é mais eficaz e “amiga do ambiente” para reduzir o número de mosquitos numa área delimitada.

Numa primeira fase, para evitar testar o conceito usando desde logo larvas de mosquito, preconizou-se a utilização de náuplios de artémia como “proxies”, i.e., substitutos/modelos das citadas larvas. A artémia salina foi a escolhida para este estudo visto apresentar uma resistência aos pesticidas semelhante à das larvas de mosquito, e ser considerada um organismo relevante em testes de toxicidade. Nesse sentido, considerou-se importante verificar a sensibilidade dos náuplios de artémia a pesticidas usados no controlo do vetor da malária. Depois da pesquisa bibliográfica sobre os pesticidas atualmente utilizados, escolheram-se para o presente estudo o DDT, o Spinosad e o Abate. Como no ambiente existem larvas de mosquito em diferentes estádios de desenvolvimento, neste estudo também se pretendeu observar se a idade dos náuplios de artémia lhe confere maior ou menor suscetibilidade aos pesticidas em estudo.

Como agente de controlo biológico da malária usaram-se os guppies, peixes larvívoros resistentes e de fácil acesso, de modo a avaliar até que ponto a sua eficiência alimentar — no presente contexto o tempo de reação à presença de alimento (artémia) e tempo total de predação (consumo) de uma quantidade standardizada de artémias — pode ser afetada por uma exposição aguda aos pesticidas em estudo.

Pretendeu-se que este estudo fundamental fosse capaz de gerar novos factos encorajadores, que justifiquem estudos adicionais para se explorar de forma detalhada a hipótese em causa, i.e., se os métodos químicos e biológicos por si só não são suficientes no controlo do vetor da malária, a sua associação pode ser mais proveitosa.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Ensaio de toxicidade aguda: Exposição de artémias a pesticidas (DDT, Spinosade e Abate)

Os pesticidas a avaliar — DDT, Spinosade e Abate — foram comprados à empresa Sigma-Aldrich e todos apresentaram uma pureza mínima de 98%. Para os ensaios de toxicidade foram realizadas diluições seriadas destes pesticidas usando-se como solventes dimetil sulfóxido (DMSO), para o DDT, água destilada (pH 5), para o Spinosade, e etanol (99%, v:v) para o Abate.

Para a incubação dos organismos teste seguiu-se o procedimento descrito no “ARC-test” (Vanhaecke e Persoone, 1984), sendo que o meio de incubação consistiu em água do mar artificial, preparada localmente com sal marinho (Tropic Marin Pro Reef Sea Salt), a 35 de salinidade.

Num recipiente cilíndrico de plástico, cerca de 150 mg de cistos de artémia salina (Ocean Nutrition lote nº ON13280) foram incubados em 200 mL de água do mar artificial, a uma temperatura de 25/26 °C, com um fotoperíodo de 14 h de luz e 12 h no escuro e a pH 8 (**Figura 8**). Após 36 h de incubação, obtiveram-se indivíduos no estado larvar (instar II/III) que foram, então, utilizados no teste de toxicidade.

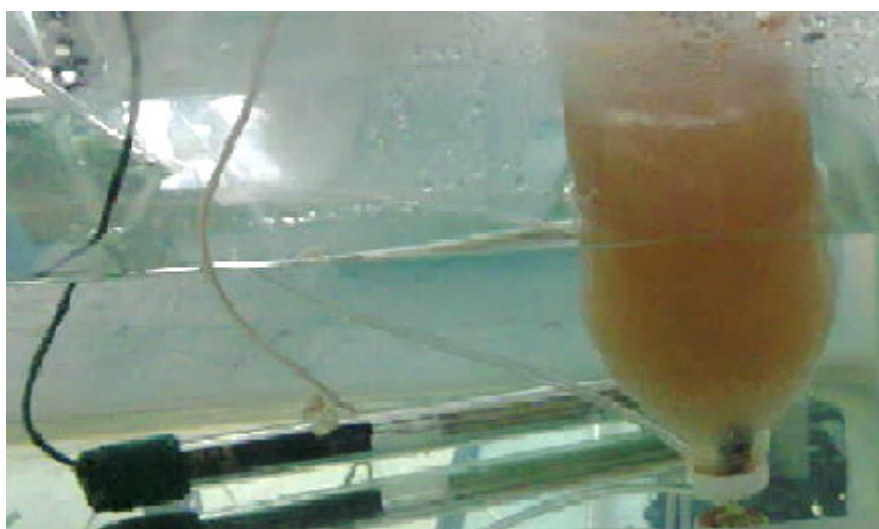


Figura 8. Berçário de artémia salina, concebido aproveitando uma garrafa plástica.

2.1.1. Desenho experimental dos ensaios com artémia

As larvas (náuplios) de artémia foram transferidas do recipiente cilíndrico para um gobelé de vidro, procedendo-se depois ao teste de toxicidade em placas plásticas multi-poços. Os náuplios com 24 h, 48 h e 72 h foram expostos a DDT (1, 2, 5, 10, 20 e 50 mg L⁻¹) e Spinosade (5, 20, 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹). As exposições com Abate (2, 8, 10, 20, 80 e 100 µg L⁻¹) foram realizadas em náuplios com 48 h de vida.

Os ensaios decorreram em condições de temperatura de 26 ± 1 °C e no escuro, sendo que a exposição aos pesticidas teve uma duração de 24 h.

Com uma micropipeta mediu-se, para cada poço das placas, um volume de 999 µL de uma solução salina, com 10-20 larvas, e 1 µL de solução controlo ou de pesticida. Cada placa foi dividida em quatro filas de 6 poços (A, B, C e D) (**Figura 9**). Foram feitas réplicas, em dias diferentes, sendo que a distribuição dos poços foi randomizada. No total foram feitas 4 réplicas de cada concentração de DDT e de Abate, enquanto o Spinosade contou com 6 réplicas. Para cada placa as sequências de controlos e pesticidas foram determinadas de forma aleatória, recorrendo-se a um serviço de geração de sequências aleatórias ("Random Sequence Generator"; www.random.org).

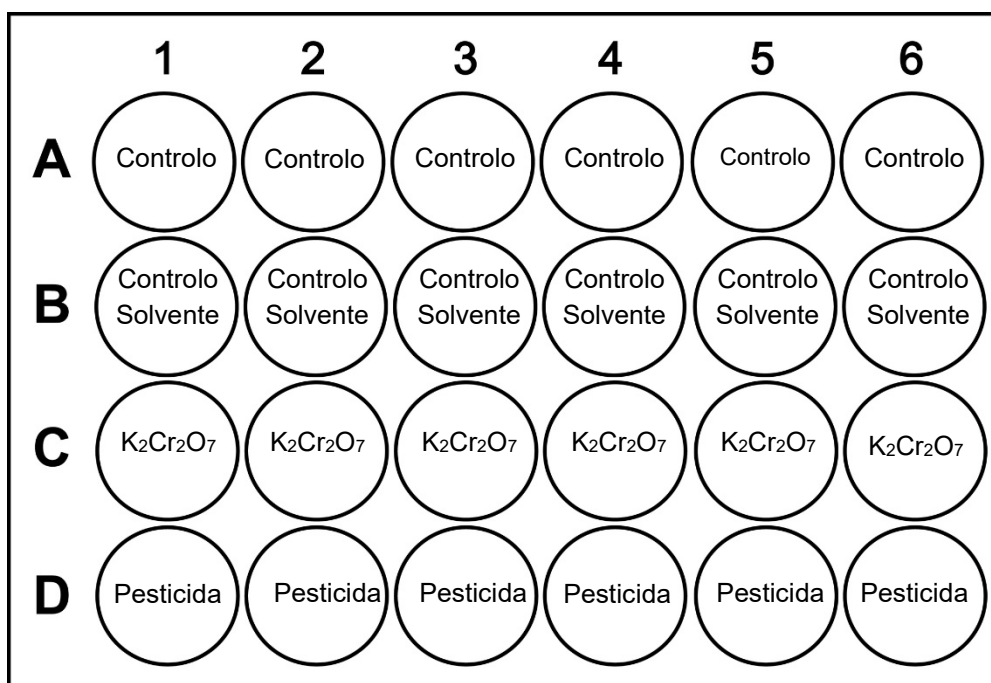


Figura 9. Exemplo da disposição dos meios de incubação nas placas para avaliação dos ensaios de toxicidade.

A **Figura 9** ilustra detalhadamente o procedimento. Numa das filas da placa, (no exemplo a **A**), adicionou-se apenas água salina (controlo), noutra (**B**) adicionou-se 1 μL de solvente (controlo solvente), numa terceira (**C**) adicionou-se dicromato de potássio (concentração final de 50 mg/L $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) e, finalmente, na última (**D**) colocou-se 1 μL de solução contendo cada pesticida em concentração crescente. Todas as placas de poços foram tapadas e colocadas na estufa a 25 °C durante 24 h (**Figura 10**).

Como controlo de qualidade foram, ainda, realizados testes de referência com diferentes concentrações de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Nestas experiências viu-se observar se as artémias usadas apresentavam a sensibilidade adequada, i.e., se exibiam um LC_{50} compatível com o referido na bibliografia (Svensson et al., 2005).



Figura 10. Estufa EHRET® usada nas experiências, contendo placas multi-poços.

2.1.2. Contagem e análise dos resultados de toxicidade aguda


As placas de poços foram observadas à lupa, tendo-se efetuado a contagem do número de larvas vivas e do número de larvas mortas em cada poço. A percentagem de mortalidade foi calculada para cada um dos poços das placas (**Tabela 4**).

Relativamente ao teste de referência com $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, procedeu-se, também, à contagem do número de larvas vivas e mortas e elaborou-se a curva de dose-resposta, tendo-se calculado o valor de LC_{50} após 24 h. Os testes foram considerados válidos quando a percentagem de mortalidade no controlo com água do mar artificial não ex-

cedesse 10 % e se o valor calculado para o LC₅₀ após 24 h de K₂Cr₂O₇ se situasse entre 30 e 50 mg/L (Svensson et al., 2005).

Após as exposições, realizou-se a contagem do número de artêmias mortas e vivas. Foram consideradas mortas aquelas artêmias que permaneceram imóveis por mais de 10 segundos após agitação suave da placa. O princípio de validação dos resultados de mortalidade implica que a mortalidade do controlo deva ser inferior a 10% (Dvorak, Benova et al. 2012).

Tabela 4. Esquematização da contagem do número de larvas vivas (V) e mortas (M) em cada placa para cálculo da percentagem de mortalidade.



	1		2		3		4		5		6	
A	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V
B	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V
C	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V
D	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V

2.2. Desenho experimental dos ensaios com guppies

Foram utilizados guppies adultos provenientes de Israel, adquiridos através de uma empresa devidamente autorizada para o efeito. Quando os animais chegaram ao laboratório executou-se a sua aclimação pelo período de 1 hora, usando um aquário designado por “tanque de quarentena”. A mudança de água de transporte para a nova água foi substituída de forma muito lenta de modo a minimizar choques térmicos e os resultantes de diferenças de outros parâmetros físico-químicos da água de transporte em relação à do laboratório. Os peixes foram mantidos em quarentena durante pelo menos 1 semana antes de se iniciarem as experiências de exposição a pesticidas.

Para as experiências, foram selecionadas apenas fêmeas, que foram mantidas em aquários individuais de 15 litros. Cada ensaio, conforme referido em baixo, usou 9 unidades experimentais independentes (1 peixe por aquário). Os grupos experimentais foram aleatoriamente formados, o que resultou em grupos homogêneos, não diferindo estatisticamente entre si em termos de biometria. Os peixes tinham um peso médio de 696,4 mg (DP = 68,2; EP = 27,8), um comprimento médio total de 4,1 cm (DP = 0,4; EP = 0,2) e ainda um comprimento *standard* de 3,4 cm (DP = 0,4; EP = 0,2 cm).

A temperatura da água foi mantida a 26 ± 1 °C, sob um fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h no escuro. Parâmetros importantes de qualidade da água (NO_3 , NO_2 e NH_3/NH_4) foram verificados a cada dois dias, recorrendo a *kits* comerciais (PRODAC), de modo a garantir que eles eram mantidos em intervalos ideais para esta espécie. O pH foi verificado com um medidor de bancada. Foram feitas trocas parciais de água uma vez por semana, juntamente com uma limpeza geral do aquário. Os guppies foram alimentados uma a duas vezes por dia, com ração composta adequada a peixes tropicais (Tropical Fish Flakes, PRODAC) ou com náuplios de artémia salina.

No contexto de cada ensaio, a capacidade predatória dos guppies foi determinada após a exposição a duas concentrações de DDT, Spinosade e Abate, uma considerada baixa (50 ng L^{-1} , $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e outra alta (500 ng L^{-1} , $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). Em cada ensaio usou-se um volume padronizado ($500 \text{ } \mu\text{L}$) de uma suspensão com 642 ± 157 (média \pm DP) náuplios de artémia. A referido volume foi retirado de uma suspensão *stock* de náuplios recém-eclodidos, conservada (a 4 °C) numa solução aquosa estéril (Instant Baby Brine Shrimp, Ocean Nutrition). Cada condição experimental foi testada em 9 aquários de 15 litros, cada um com um exemplar (**Figura 11**).

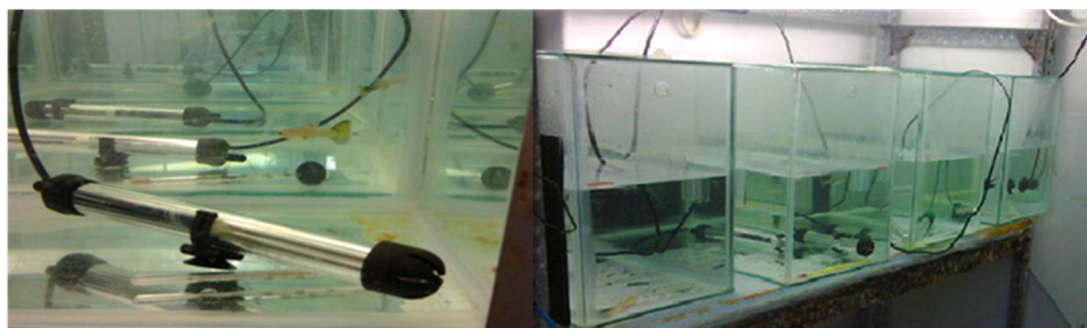


Figura 11. Aquários usados nas experiências com guppies.

Antes do ensaio de voracidade cada peixe esteve sujeito a um jejum de 48 h. Após este período, foi adicionado a cada aquário um volume de $750 \text{ } \mu\text{L}$ de DMSO (ensaio com DDT), etanol absoluto (ensaio com Abate) ou de água (ensaio com Spinosade), que serviram como controlos dos respetivos ensaios. Vinte e quatro horas depois da adição da solução controlo, introduziu-se os $500 \text{ } \mu\text{L}$ da suspensão de artémia, em cada aquário, e determinaram-se os:

- **Tempo de reação**, i.e., o período de tempo entre a introdução da artémia e o momento em que o peixe começou a comer;

- **Tempo de alimentação**, i.e., o período de tempo que o peixe esteve a comer a artémia, portanto até à saciedade, subtraído de pausas ocorridas durante a predação.

2.3. Análise estatística dos resultados

Os resultados foram analisados estatisticamente recorrendo ao programa “IBM SPSS Statistics 21”. Os resultados foram expressos através de média \pm erro padrão (Média \pm SE). Quanto à análise dos testes de exposição a artémia, os testes de Levene's e de Shapiro-Wilk foram previamente utilizados, respetivamente, para verificação do teste de homogeneidade de variância e da normalidade dos resultados. Como se verificou haver algumas situações de violação dos pressupostos anteriores, foi inicialmente usado um teste não paramétrico de análise de variância (ANOVA) “on ranks”, para averiguar se havia diferenças entre situações. Dada a inexistência de testes de ANOVA não paramétrica para análise de multifatorial, foi feita uma abordagem unifatorial. De qualquer modo, face à concordância havida entre o estudo não-paramétrico e uma abordagem com ANOVA paramétrica, optou-se por esta, dado que tem mais poder estatístico. Após cada ANOVA significativa, a comparação “post-hoc” entre pares foi feita com o teste de Tamhane's T2. O nível de significância estatística foi de 5%.

3. RESULTADOS

3.1. Exposição de artémia (*A. salina*) a pesticidas

3.1.1. Exposição da artémia a DDT

Na **Figura 12** está apresentada a taxa de mortalidade da artémia exposta ao DDT, considerando os vários grupos experimentais e agrupando as concentrações e os tempos de exposição. Assim, tendo em conta o fator grupo, observa-se que $\approx 40\%$ das artémias morreu após ser exposta ao pesticida. Esta taxa de mortalidade foi quatro vezes mais elevada do que a mortalidade do controlo (CTR) e do controlo solvente (CTR-SOLV) ($p < 0,001$) e idêntica à do controlo positivo (DP).

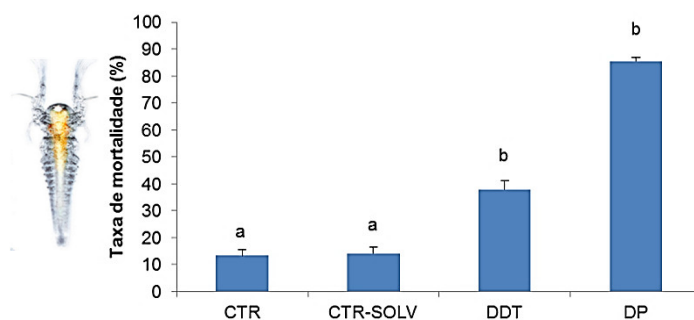


Figura 12. Taxa de mortalidade (%) da artémia exposta a DDT (concentrações agrupadas). As barras representam média \pm SE. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as condições testadas ($p < 0,05$).

A taxa de mortalidade global da artémia, em experiências de exposição a diferentes concentrações de DDT, está apresentada na **Figura 13**. Observa-se que a taxa é independente da concentração de DDT testada. Apesar da estatística descritiva sugerir um aumento com a concentração, não há de facto diferenças significativas. É importante referir que tanto para o DDT, como para o Spinosade e Abate (descritos mais adiante), os grupos de controlo negativo (CTR/CTR-SOLV) e de controlo positivo, não diferiram significativamente dos respetivos pares, quando comparados entre os ensaios com várias concentrações de pesticidas; podendo na prática serem agrupáveis.

A influência da idade da artémia (24 h, 48 h ou 72 h) em relação à sua suscetibilidade ao DDT pode ser observada na **Figura 14**. Os resultados indicam que esta diminuiu com a idade ($p < 0,001$). Assim, a taxa de mortalidade da artémia com 24 h de

vida foi de quase 80%, enquanto as artêmias com 48 h ou 72 h de vida apresentaram taxas de mortalidade de $\approx 40\%$ e de $\approx 20\%$, respetivamente (**Figura 14**).

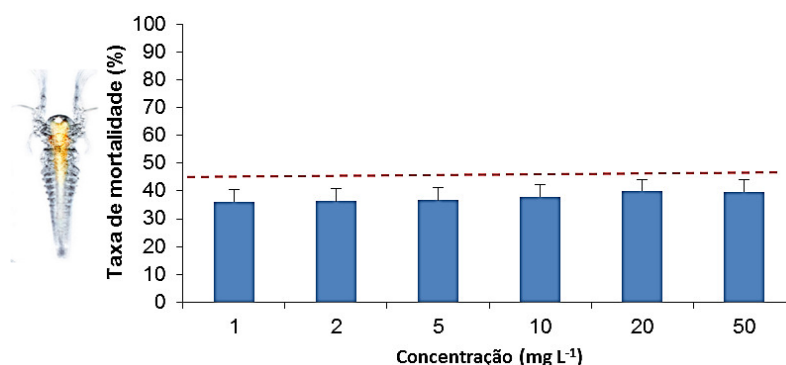


Figura 13. Taxa de mortalidade (%) global da artémia nas experiências com diferentes concentrações de DDT (mg L⁻¹). As barras representam a média \pm SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.

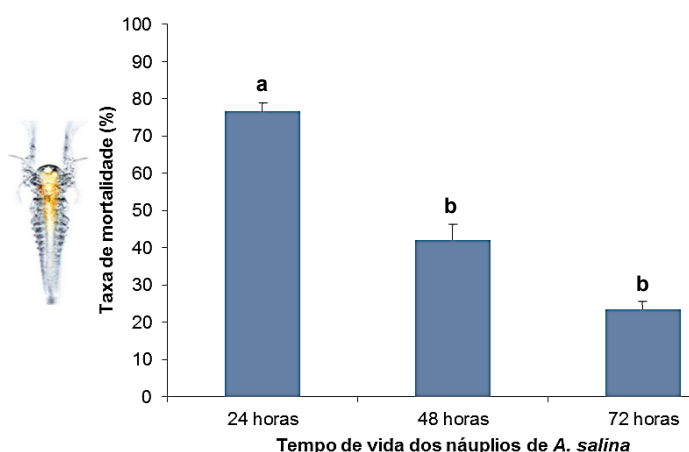


Figura 14. Taxa de mortalidade (%) da artémia com diferentes idades, exposta a DDT (concentrações agrupadas). As barras representam a média \pm SE. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as condições testadas ($p < 0,001$).

3.1.2. Exposição de artémia a Spinosade

Na **Figura 15** está apresentada a taxa de mortalidade da artémia exposta ao Spinosade. Observa-se que $\approx 40\%$ da artémia morreu após ser exposta ao pesticida. Esta taxa de mortalidade foi de quase quatro vezes mais elevada do que a mortalidade apresentada no CTR, sendo inferior à do controlo positivo (DP) ($p < 0,001$).

A taxa de mortalidade global da artémia nas experiências dedicadas a testar as diferentes concentrações de Spinosade estão apresentadas na **Figura 16**. Observa-se que a referida taxa genérica foi sempre independente da concentração do pesticida.

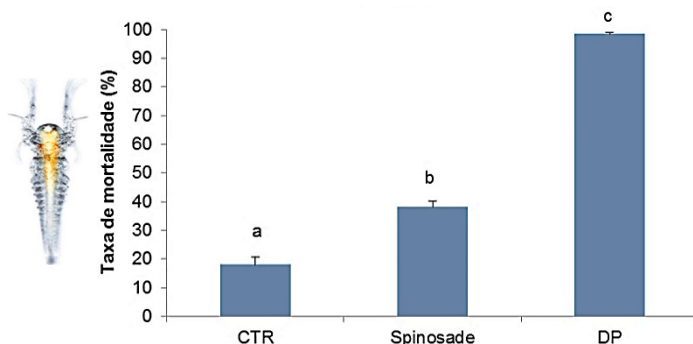


Figura 15. Taxa de mortalidade (%) da artémia exposta a Spinosade (concentrações agrupadas). As barras representam a média \pm SE. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as condições testadas ($p < 0,001$).

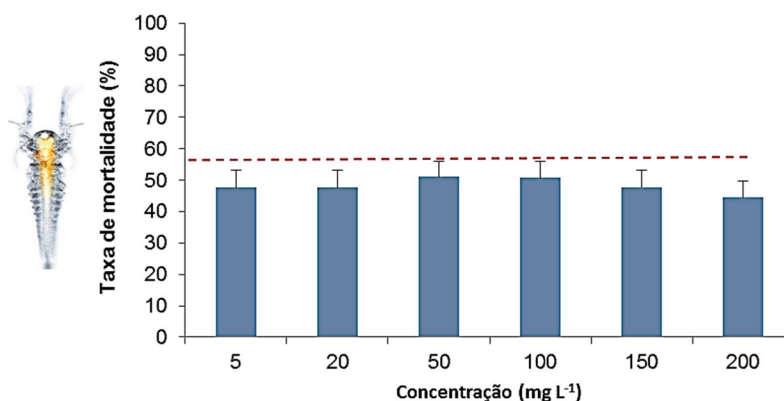


Figura 16. Taxa de mortalidade (%) global da artémia nos ensaios com diversas concentrações de Spinosade (mg L⁻¹). As barras representam a média \pm SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.

A influência da idade da artémia (24 h, 48 h ou 72 h) em relação à sua suscetibilidade ao Spinosade pode ser observada na **Figura 17**. Estes resultados mostram que os animais com 48 h foram os menos sensíveis ao Spinosade (taxa de mortalidade de $\approx 35\%$), seguidos daqueles com 24 h (taxa de mortalidade de $\approx 45\%$). A artémia com 72 h foi a mais suscetível ao Spinosade uma vez que a sua taxa de mortalidade foi próxima aos 65%, um valor significativamente superior face aos das outras idades.

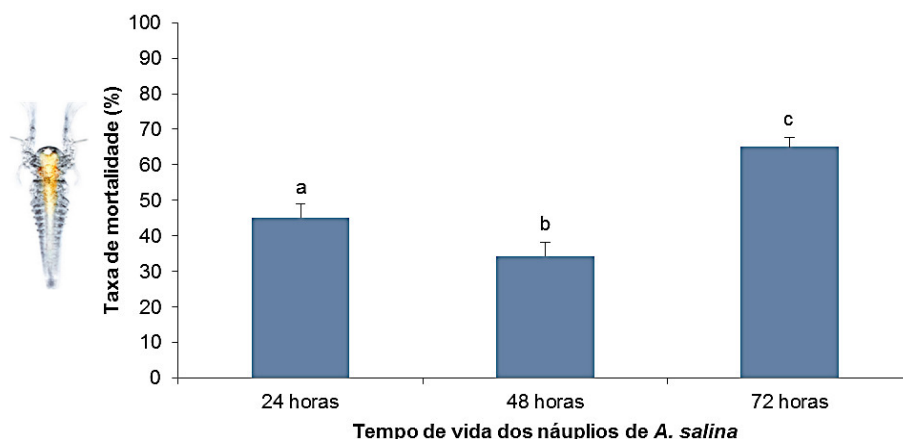


Figura 17. Taxa de mortalidade (%) da artémia com diferentes idades, exposta a Spi-nosade (concentrações agrupadas). As barras representam a média \pm SE. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as condições testadas ($p < 0,001$).

3.1.3. Exposição de artémia a Abate

A taxa de mortalidade da artémia exposta ao Abate indicou que este pesticida não exerceu um efeito significativo sobre a sua mortalidade, cuja taxa foi de aproximadamente de 10%, muito semelhante à dos grupos CTR e CTR-SOLV (**Figura 18**).

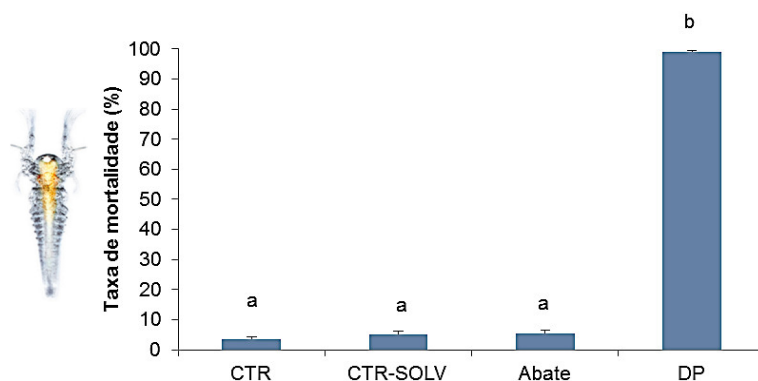


Figura 18. Taxa de mortalidade (%) da artémia exposta a Abate (concentrações agrupadas). As barras representam a média \pm SE. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as condições testadas ($p < 0,001$).

A taxa de mortalidade global da artémia em experiências que testaram diferentes concentrações de Abate, estão apresentadas na **Figura 19**. Observa-se que a taxa em cada ensaio foi independentemente da concentração de pesticida testada.

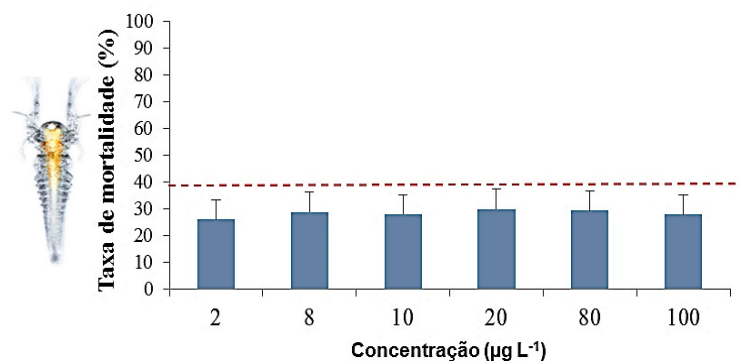


Figura 19. Taxa de mortalidade (%) global da artémia exposta a diferentes concentrações de Abate ($\mu\text{g L}^{-1}$). As barras representam a média \pm SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.

3.2. Exposição do guppy a pesticidas

3.2.1. Exposição do guppy a DDT

Os resultados destas experiências (**Figuras 20-22**) indicam que guppies expostos a DDT, independentemente da concentração usada, não diminuem o seu apetite nem reagem de forma diferente (ou seja, nem mais rápida nem mais lentamente) da dos controlos à presença do alimento, que neste caso foi náuplios de artémia.

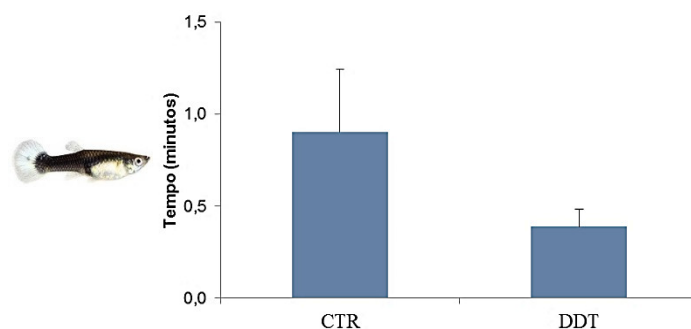


Figura 20. Tempo de reação à presença de alimento (artémia), nos grupos de guppies controlo e expostos a DDT (concentrações agrupadas). As barras representam a média \pm SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.

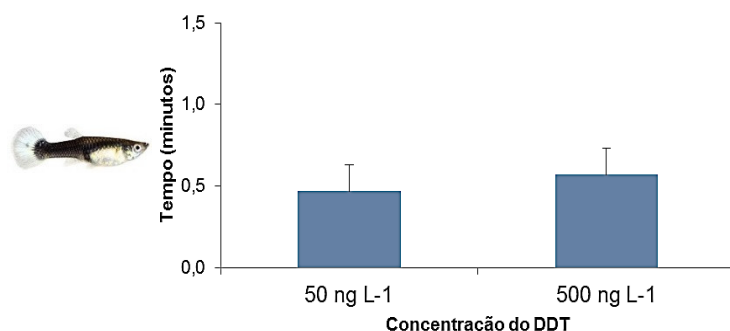


Figura 21. Comparação entre o tempo de reação à presença de alimento (artémia) nos grupos de guppies expostos a DDT (50 e 500 ng L⁻¹). As barras representam a média \pm SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.

O tempo de exposição a DDT (duração do ensaio) — apesar do aspeto sugestivo de uma evolução decrescente dos valores médios (**Figura 22**) — não afetou significativamente a rapidez de reação dos peixes à presença do alimento (pelo menos segundo a estatística utilizada), sendo que a média deste variou de $\approx 0,3$ a $0,8$ min.

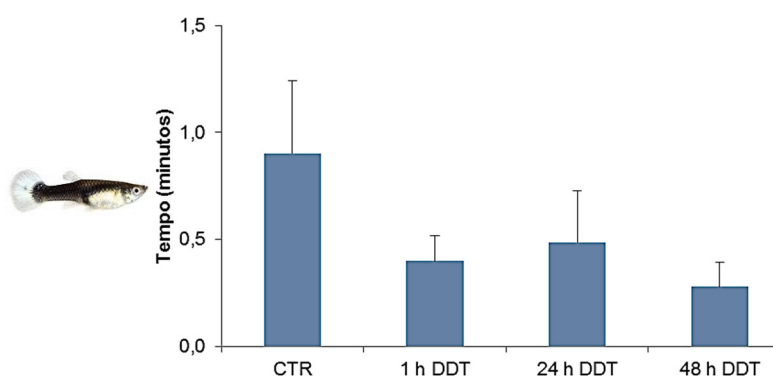


Figura 22. Comparação entre o tempo de reação do guppy à presença de alimento (artémia) na situação CTR comparativamente à exposição a DDT (concentrações agrupadas), durante 3 tempos distintos designadamente 1 h, 24 h e 48 h. As barras representam a média \pm SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.

Na **Figura 23** observa-se que os animais expostos a DDT demoraram, em média, menos tempo a comer ($\approx 4,5$ min), comparativamente ao grupo controlo (≈ 6 min).

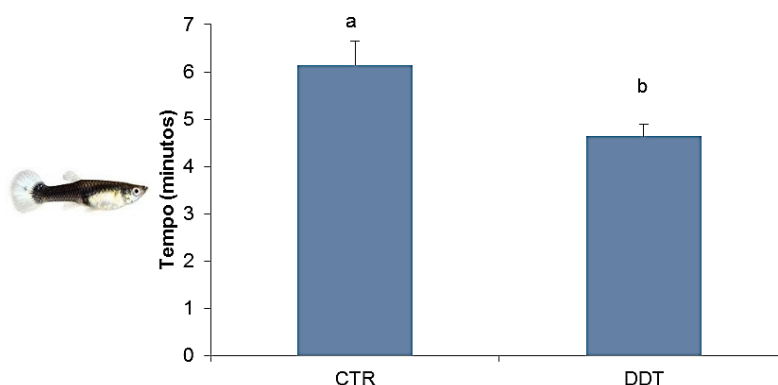


Figura 23. Tempo total que os guppies demoram a alimentar-se no grupo controlo e no exposto a DDT (concentrações agrupadas). As barras representam a média \pm SE e letras diferentes indicam diferenças significas entre os grupos ($p < 0,01$).

Além disso, observou-se que animais expostos à concentração mais alta de DDT (500 ng L⁻¹) demoraram 4,5 min a alimentar-se, enquanto os peixes que foram expostos à concentração mais baixa deste pesticida (50 ng L⁻¹) demoraram, em média, significativamente mais tempo (5,5 min). A análise da **Figura 24** mostra que animais expostos a concentração de DDT mais elevada desinteressaram-se mais rapidamente pela presa do que os peixes expostos à mais baixa concentração deste pesticida ($p < 0,05$).

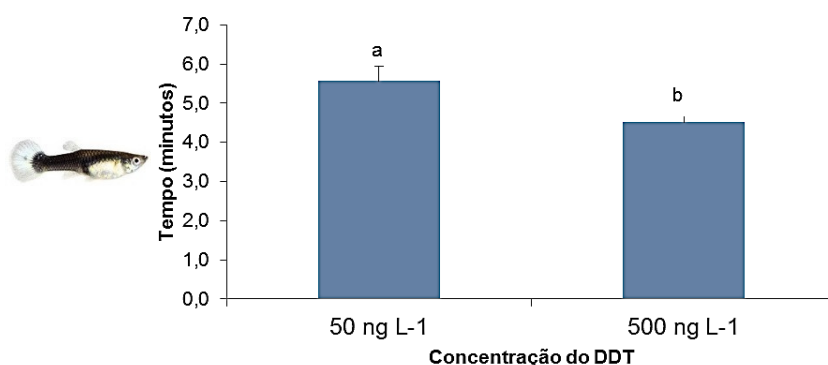


Figura 24. Tempo global que dois grupos de guppies expostos a DDT (50 e 500 ng L⁻¹) demoram a alimentar-se. As barras representam a média \pm SE e letras diferentes indicam diferenças significas entre os grupos ($p < 0,05$).

O tempo que os guppies consumiram com a tarefa de se alimentar também foi afetado significativamente pelo tempo de exposição destes ao DDT. Assim, observou-se que após 24 h de exposição, os peixes demoraram menos tempo a comer a artémia, do que o grupo controlo ($p < 0,05$) (**Figura 25**).

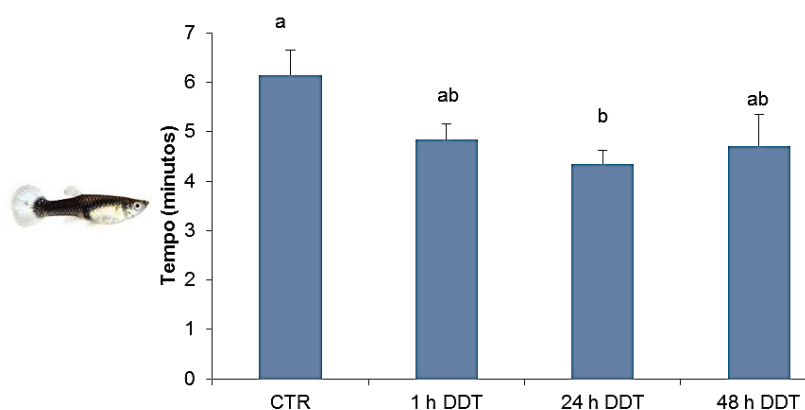


Figura 25. Comparação entre o tempo que os animais demoraram a alimentar-se na situação controle e após exposição a DDT (concentrações agrupadas), durante 3 tempos distintos (1 h, 24 h e 48 h). As barras representam a média \pm SE e letras distintas indicam diferenças significativas entre grupos ($p < 0,05$).

3.2.2. Exposição do guppy a Spinosade

A **Figura 26** mostra que, comparativamente com o grupo controle, os guppies expostos a Spinosade diminuíram em cerca de três vezes o seu tempo de reação à presença de alimento (náuplios de artémia) ($p < 0,01$).

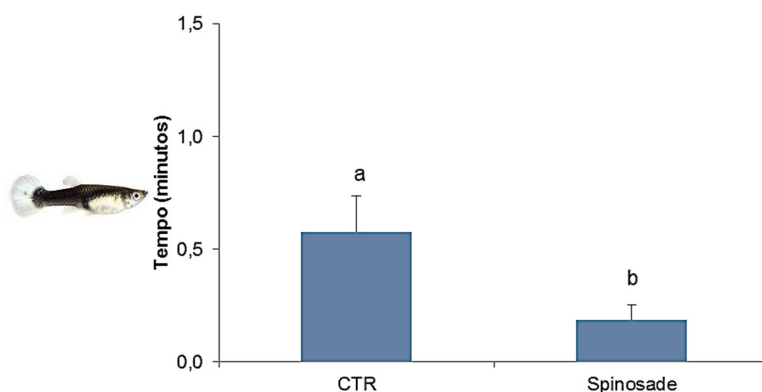


Figura 26. Tempo de reação à presença de alimento (artémia) no grupo de controle (CTR) e após exposição a Spinosade (concentrações agrupadas). As barras representam a média \pm SE e letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Por outro lado, a concentração do Spinosade não parece afetar a rapidez de resposta dos guppies à introdução da artémia no aquário (**Figura 27**). Aqui, os tempos de reação que variaram entre 0,3 minutos (concentração alta, $50 \mu\text{g L}^{-1}$) e 0,2 minutos (concentração baixa, $5 \mu\text{g L}^{-1}$).

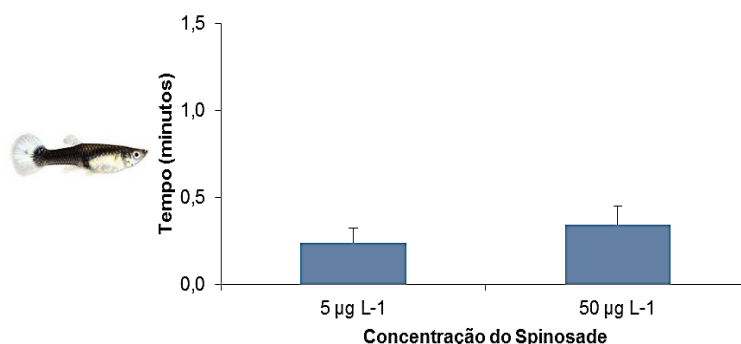


Figura 27. Tempo de reação à presença de alimento (artémia) nos grupos de guppies expostos a Spinosade (5 e 50 µg L⁻¹). As barras apresentam a média ± SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.

Em contraste, a duração da exposição dos guppies ao Spinosade influenciou a rapidez como estes reagiram à presença de alimento. Deste modo, observa-se que após 24 e 48 h de exposição ao Spinosade o tempo de reação médio dos animais, 0,08 e 0,04 min, respetivamente, diminuiu significativamente em relação ao grupo controlo (0,58 min) (**Figura 28**).

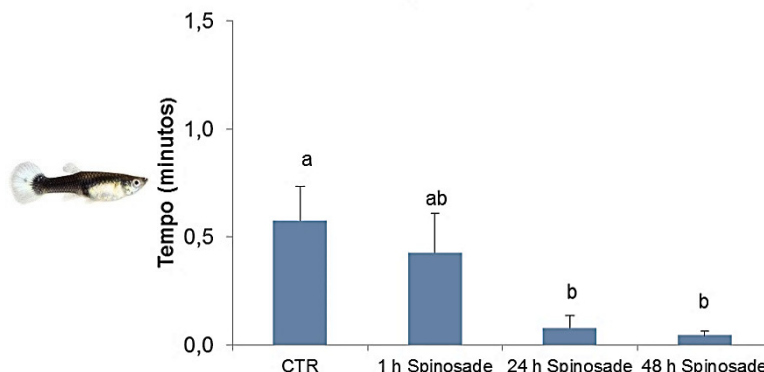


Figura 28. Tempo de reação à presença de alimento (artémia) na situação de controlo (CTR) e após exposição a Spinosade (concentrações agrupadas), durante 3 tempos distintos (1 h, 24 h e 48 h). As barras representam a média ± SE e letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos ($p < 0,05$).

Relativamente ao tempo que os guppies demoraram a comer a artémia, os resultados destas experiências mostram que este não foi afetado pela exposição dos animais a Spinosade (**Figura 29**).

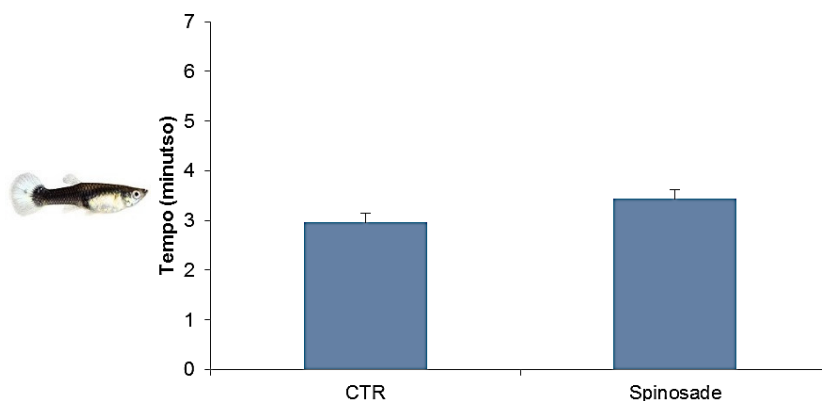


Figura 29. Tempo total de alimentação dos guppies na situação de controlo (CTR) e após a exposição a Spinosade. As barras representam a média \pm SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.

Também diferentes concentrações de Spinosade (alta e baixa) não afetaram o tempo que os animais demoraram a alimentar-se (**Figura 30**).

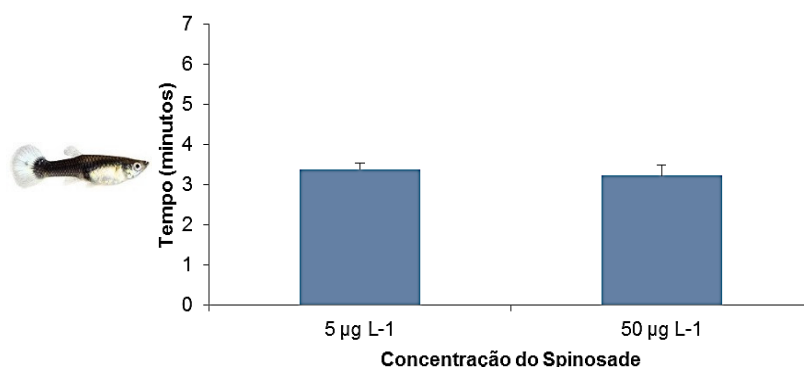


Figura 30. Tempo global que dois grupos de guppies expostos a Spinosade (5 e 50 µg L⁻¹) demoram a alimentar-se. As barras representam a média \pm SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.

O tempo total que os guppies gastaram com para se alimentarem não foi afetado significativamente pelo tempo de exposição destes ao Spinosade (**Figura 31**).

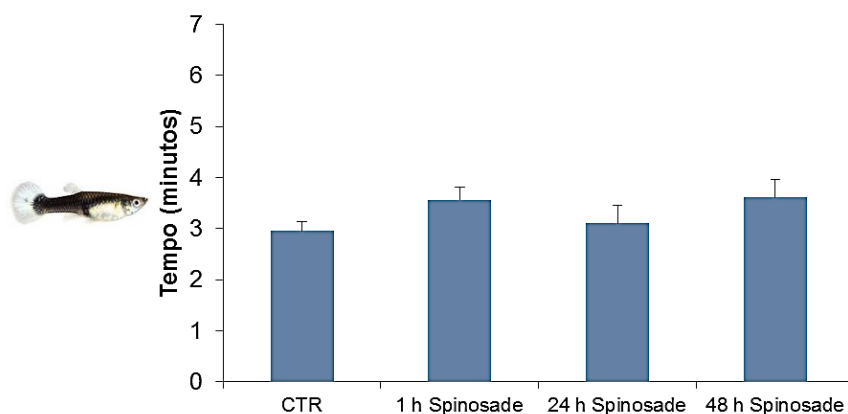


Figura 31. Tempo que os animais consumiram para se alimentarem, no grupo controle e após exposição a Spinosade (concentrações agrupadas) durante 3 tempos (1 h, 24 h e 48 h). As barras mostram a média \pm SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.

3.2.3. Exposição do guppy a Abate

A **Figura 32** mostra os resultados relativos ao tempo de reação à presença de alimento (náuplios de artémia), entre guppies controle *versus* expostos a Abate, indicando que o mesmo diminuiu significativamente ($p < 0,001$).

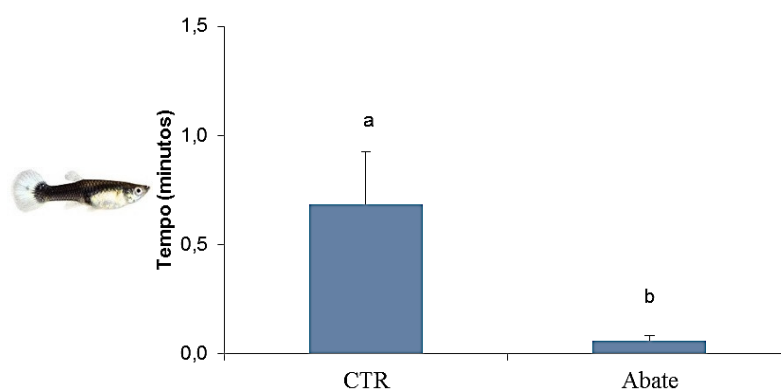


Figura 32. Tempo de reação à presença de alimento (artémia) nos grupos de guppies controle e expostos a Spinosade (concentrações agrupadas). As barras mostram a média \pm SE e letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,001$).

A **Figura 33** mostra que a concentração do Abate não parece afetar a rapidez de resposta dos guppies à introdução da artémia no aquário. Aqui, os tempos de reação que foram de $\approx 0,2$ minutos, tanto para a concentração baixa ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) como para a alta ($100 \mu\text{g L}^{-1}$).

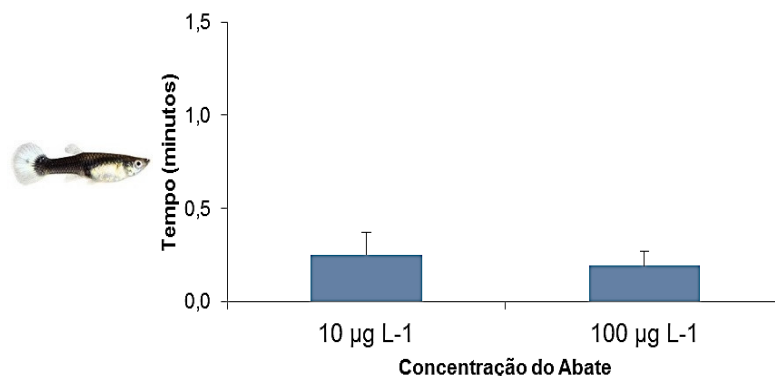


Figura 33. Tempo global que dois grupos de guppies expostos a Abate (10 e $100 \mu\text{g L}^{-1}$) demoram a reagir ao alimento. As barras representam a média \pm SE.

Também, a duração da exposição dos guppies ao Abate não parece influenciar a forma como estes reagem à presença de alimento (**Figura 34**).

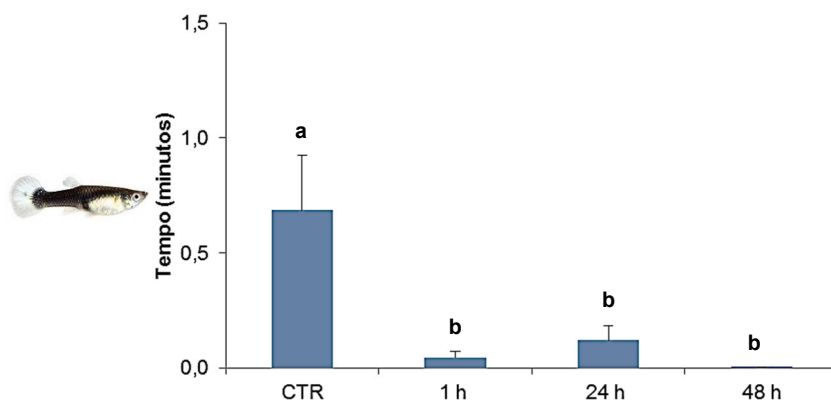


Figura 34. Tempo de reação à presença de alimento (artémia) na situação de controlo comparativamente ao grupo de guppies expostos a Abate, durante 3 tempos distintos (1 h, 24 h e 48 h). As barras representam a média \pm SE e letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos ($p < 0,01$).

As **Figuras 35-37** mostram os tempos médios de duração da predação de guppies expostos a Abate, considerando quer as distintas concentrações quer os diferentes períodos de exposição. Em particular, a **Figura 35** mostra que peixes expostos ao pesticida demoram menos tempo a alimentar-se que os do grupo controlo.

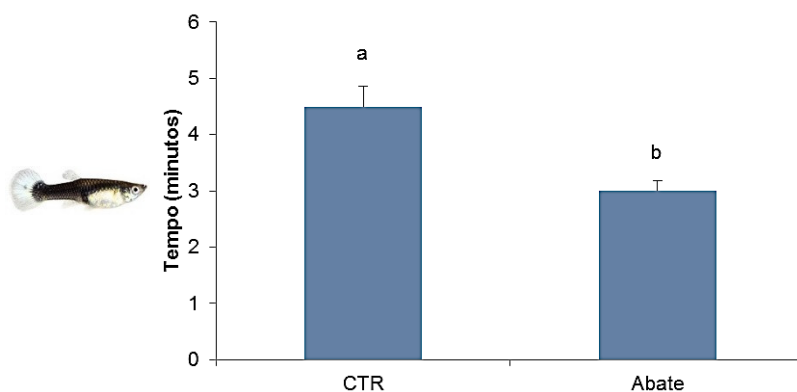


Figura 35. Tempo que os guppies demoram a alimentar-se na situação de controlo (CTR) e após a exposição a Abate (concentrações agrupadas). As barras representam a média \pm SE e letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,001$).

A **Figura 36** mostra que diferentes concentrações de Abate não afetaram o tempo que os animais demoraram a alimentar-se. No entanto, comparativamente com o grupo controlo, o gráfico da **Figura 37** mostra que o tempo de exposição dos animais ao Abate afeta significativamente o tempo que os animais demoram a alimentar-se.

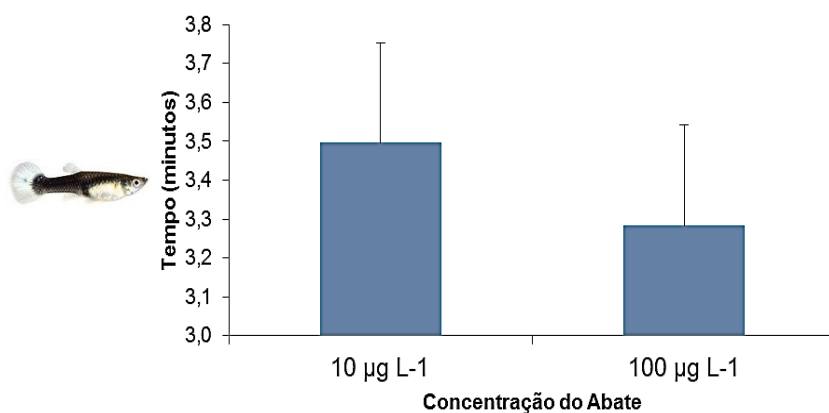


Figura 36. Tempo global que dois grupos de guppies expostos a Abate (10 e 100 µg L⁻¹) demoram a alimentar-se. As barras representam a média \pm SE. Não há diferenças estatisticamente significativas.

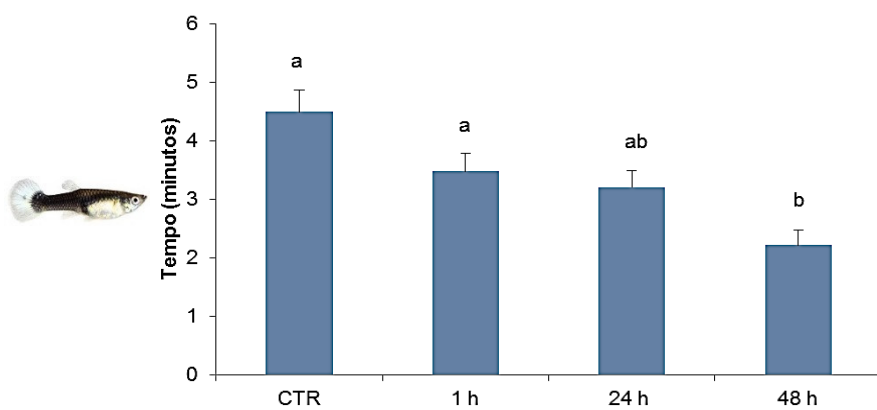


Figura 37. Tempo que os animais despenderam a alimentar-se na situação de controlo (CTR) e após a exposição a Abate (concentrações agrupadas), durante 3 tempos distintos (1 h, 24 h e 48 h). As barras representam a média \pm SE e letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Tendo em consideração o potencial apresentado por náuplios de artémia salina (*A. salina*) como substituto experimental de larvas de mosquito (estas mais dispendiosas e difíceis de manter), averiguou-se a sua sensibilidade a três pesticidas usados no controlo do vetor da malária, nomeadamente o DDT, o Spinosade e o Abate. Tendo em conta as evidências, os dois últimos terão menos impactos ambientais, pelo que o seu uso face a outros agentes mais ecotóxicos, como o DDT, parece ser vantajosa. Assim, a compreensão da toxicidade de pesticidas de interesse sobre a *A. Salina*, em laboratório, ajudará a fundar melhores paralelismos e a entender as diferenças entre os organismos “proxy” e os alvos de real interesse, no caso as larvas de mosquitos.

A seleção da espécie *A. salina*, além das vantagens referidas anteriormente no **Capítulo 1**, prendeu-se também com o facto de esta ser usada como modelo em ensaios de toxicidade e apresentar, tal como as larvas dos mosquitos, resistência a pesticidas. Na verdade comparativamente com outros microcrustáceos, tais como a dáfnia (*Daphnia magna* e *D. pulex*) (Nunes, Carvalho et al. 2006) a artémia apresenta para o DDT valores de LC_{50} muito elevados, i.e., entre 151 mg L^{-1} e 571 mg L^{-1} (Kirdsook 1993).

Neste estudo, e embora não tenha sido possível o cálculo dos valores de LC_{50} para a estirpe de artémia utilizada, verificou-se que, nas concentrações usadas, tanto o DDT como o Spinosade apresentaram taxas de mortalidade na ordem dos 40% - 50%. Já a taxa de mortalidade da artémia exposta a Abate foi semelhante à dos grupos controlo. Neste último caso os dados sugerem haver diferenças entre o comportamento da artémia e de larvas de mosquito face à presença deste pesticida. De facto, alguns estudos indicam que larvas de anófeles (*A. albopictus* e *A. stephensi*) são sensíveis ao Abate, apresentando concentrações de LC_{50} de $0,013 \text{ mg L}^{-1}$ (Marten, Che et al. 1993) ou de $1,613$ e $3,388 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, em estudos de laboratório e campo respetivamente (Vatandoost and Hanafi-Bojd 2005).

Apesar das indicações dos fabricantes sobre a eficácia do Abate no combate ao vetor da malária (e.g., ver <https://agriculture.basf.com/en/Pest-Control/Abate.html>), o mesmo não parece estar a ser usado prioritariamente para eliminar larvas de mosquito. Tendo em conta os nossos dados quanto à resistência das artémias ao Abate, podemos inferir a possibilidade deste pesticida não ser tão eficaz, pelo menos para os propósitos deste estudo, sugerindo o uso preferencial de Spinosade sobre o Abate, em

contraposição ao DDT, no controlo da propagação da malária. Os nossos resultados estão de acordo com um estudo em que foram testadas eficácias relativas de Spinosade e Abate sobre as larvas dos mosquitos *A. gambiae* e *Aedes aegypti*, apontando-se para maior toxicidade do Spinosade (Kemabonta and Nwankwo, 2013).

Em relação ao Spinosade, existem mais estudos que comprovam a eficácia deste larvicida. Por exemplo, foram reportadas taxas de mortalidade para larvas de mosquito, entre 53,2 e 98,5 %, quando aplicado a uma concentração de 0,054 mg L⁻¹ (Bahgat et al. 2007). Estudos semelhantes realizados em mosquitos de anófeles (*A. albimanus*) apontam a necessidade de concentrações mais elevadas de Spinosade (0,025 mg L⁻¹) para serem atingidas taxas de mortalidade na ordem dos 50% (Bond et al. 2004). Neste sentido, concentrações de 1 a 5 mg L⁻¹ de Spinosade aplicado durante 6 a 8 semanas foram eficazes no combate das larvas de *A. aegypti*, *A. albopictus*, *C. quinquefasciatus* e *C. coronator* (Bond et al. 2012). No entanto, como se pode deduzir destes exemplos, as concentrações eficazes são muito variáveis entre diferentes estudos. Provavelmente, tal deve-se não só à espécie de mosquito a eliminar mas também ao seu estado de desenvolvimento, a sua resistência a pesticidas, à duração do tratamento e ao habitat em causa (Hertlein et al. 2010). Assim, quando se tentar transpor este tipo de estudos para o ambiente, e depois de primeiros estudos piloto, i.e., para despiste, dever-se-á usar larvas de mosquitos de espécimes endémicos dos locais onde se pretende vir a aplicar o pesticida, nomeadamente o Spinosade, de forma a se poder usar as suas concentrações ideais que, como se pôde observar na literatura, poderão ser diferentes mesmo dentro a mesma espécie.

Como neste estudo foram utilizadas concentrações de Spinosade entre 5 e 200 mg L⁻¹ e, independentemente da concentração usada, a taxa de mortalidade das larvas em estudo foi sempre idêntica à do DDT, coloca-se a hipótese da artémia ser ainda mais resistente a estes pesticidas do que as larvas de mosquito utilizadas nos trabalhos supracitados. De facto, tem vindo a observar-se que tanto para a artémia como para mosquitos há um aumento da resistência aos pesticidas ao longo dos anos (Patin 1982; Raghavendra et al. 2010; Nazni et al. 2005; N'Guessan et al. 2010; Mutunga et al. 2015). Estes resultados sugerem que a independência da concentração em função das taxas de mortalidade para o DDT e Spinosade pode ser devida a dois fatores, um é a possibilidade de a estirpe de artémia usada neste estudo não morrer mesmo atingidos os máximos de solubilidade de ambos os pesticidas em água e o outro é haver um número limitado de recetores celulares na artémia, e esses, uma vez bloqueados, independentemente da concentração externa produzirão sempre a mesma resposta.

Ambas estas possibilidades podem justificar a invariabilidade da percentagem de mortalidade tanto para o DDT como para o Spinosade.

Como num qualquer ambiente as larvas tanto de mosquito como de microcrustáceos apresentam regra geral várias idades, realizaram-se estudos relativos à sensibilidade da artémia aos pesticidas em função desta. Os testes feitos revelaram que a sensibilidade da artémia ao DDT diminuiu com o envelhecimento dos náuplios. Embora estes resultados não sejam corroborados para o DDT pelo trabalho de Sánchez-Fortún et al. (1995), são-no de facto para o Spinosade, cujas larvas se tornaram mais sensíveis às 72 h de vida comparativamente com as de 24 h. Suspeitamos pois que no caso do DDT, provavelmente, há diferenças entre fatores abióticos do nosso trabalho e os do estudo anterior, com relevância nas respostas (Nunes, Carvalho et al. 2006).

Com o objetivo de aliar o método de controlo químico ao biológico para o controlo da propagação da malária, após se ter observado qual o tipo de impacto que os tês pesticidas em estudo exerceram sobre náuplios de artémia procedeu-se à investigação do impacto que estes compostos exercem sobre uma espécie de peixe larvívora. Deste modo, pretende-se gerar dados que apoiem a implementação, no terreno, da “estratégia química”, que como se viu anteriormente é sujeita a inúmeros fatores que a podem tornar ineficaz, combinada à “guerra biológica”. Portanto, é importante encontrar o(s) larvicida(s) capaz(es) de diminuir drasticamente o número de larvas de mosquito em águas quentes e paradas e simultaneamente escolher uma espécie de peixe larvívora capaz de se alimentar das restantes sem que a presença destes compostos afetem a sua capacidade predatória (Anogwih et al. 2013; Anogwih et al. 2015).

De entre as várias espécies de peixes o guppy (*P. reticulata*) tem sido considerado um dos melhores agentes de controlo biológico para combater a malária. Na realidade a simples introdução de guppies em vários locais de crescimento de larvas de mosquito reduziu de modo eficiente a população de mosquitos de anófeles (Nalim and Tribuwono 1987; Sabatinelli et al. 1991; Gupta et al. 1992; Rajnikant et al. 1993). Como resultado do decréscimo destas populações, observou-se em alguns dos locais estudados redução significativa da incidência de malária. Por exemplo na ilha Grande Comore, localizada na entrada do canal de Moçambique, a introdução do guppy conduziu a uma redução da incidência da malária de cerca de 41% para 6% ao fim de apenas um ano (Sabatinelli et al. 1991).

Sabe-se que em condições ótimas, por dia cada guppy consome, cerca de 30 larvas de mosquito (Chatterjee and Chandra 1997; Anogwih and Makanjuola 2010). No entanto, importa realçar os fatores que podem afetar a taxa de consumo de larvas pelos guppies designadamente, o volume de água, o número de predadores (Ghosh et al. 2005) e a densidade de larvas de mosquito (Mannaa et al. 2008). Por exemplo, em laboratório, uma densidade larvar superior a 2 larvas por litro diminui a capacidade larvívora do guppy (Anogwih and Makanjuola 2010). Também outros fatores, tais como a presença de pesticidas na água, poderão afetar a eficiência predatória do guppy (Anogwih et al. 2015); um dos aspetos fundamentais estudados nos nossos ensaios.

Como pouco se sabe sobre o efeito que a concentração de pesticidas como o DDT, Spinosade e Abate poderão ter sobre a capacidade predatória dos peixes, neste estudo foi considerada a exposição de guppies a duas concentrações, uma considerada baixa e outra alta, para cada um dos três pesticidas anteriormente referidos. Desta forma, este estudo revelou que, comparativamente com o grupo controlo, só o DDT não teve qualquer efeito significativo sobre o tempo de reação dos guppies à introdução de larvas de artémia nos aquários. Porém, o tempo que estes animais demoraram a comer até se saciarem diminuiu de modo significativo após a exposição a DDT, sugerindo que este pesticida diminui a capacidade predatória (i.e., o apetite) do guppy. Observou-se ainda que esse efeito é potenciado com o aumento do tempo de exposição dos animais ao DDT. Em contraste, a exposição de guppies ao Abate e Spinosade diminuiu significativamente o tempo de reação à introdução das artémias nos aquários; facto intrigante, especulando-se ser um efeito de eventual ação de hiperexcitabilidade. Além disso, e só para o Spinosade, e independentemente da concentração, uma vez reconhecida a presença de alimento, os peixes mantiveram a sua capacidade predatória inalterada, não reduzindo o tempo total de predação (saciando-se como o controlo).

Estes resultados concordam com resultados prévios obtidos com guppies expostos a diferentes pesticidas, incluindo o Spinosade ($49 \mu\text{g L}^{-1}$), em que tal como agora, se observou não haver perda da atividade predatória destes animais (Anogwih et al. 2015); no estudo em questão não se identifica o sexo dos guppies. Importa ainda realçar que a aplicação de Spinosade ($59 \mu\text{g L}^{-1}$ e $73 \mu\text{g L}^{-1}$), em aquários com guppies alimentados com larvas de mosquitos de anófeles, não produziu qualquer efeito letal nos peixes, embora tenha produzido a morte a 50% das larvas (Anogwih et al. 2015). É muito interessante verificar a concordância de resultados gerais obtidos no presente estudo, usando a artémia, com o estudo de Anogwih et al. (2015), larvas de mosquito. Tal facto reforça a ideia da utilidade da artémia como organismo modelo no contexto.

Como no ambiente os animais estão expostos aos pesticidas mais do que apenas umas horas, os parâmetros de reação à presença de larvas e o tempo que os animais demoram a alimentar-se foi avaliada ao longo do tempo, i.e., 1 h, 24 h e 48 h. Estas experiências revelaram que tanto os animais expostos a DDT como a Abate não perderam interesse quando visualizaram o alimento, no entanto em ambos os grupos ocorreu uma diminuição progressiva do tempo usado pelos guppies na tarefa de se alimentarem. Já os peixes expostos ao Spinosade além de reagirem até mais rapidamente que os controlos à presença da presa, e ao contrário do verificado para o DDT e Abate, não registaram nenhuma alteração comportamental significativa na predação, gastando igual tempo que controlo para ingerir náuplios até à saciedade. Deste modo, foi o Spinosade que potenciou a ingestão de um maior número de larvas. Este resultado está em sintonia com a conclusão de Anogwih et al. (2013), segundo a qual o Spinosade, dissolvido na água (pelo menos até $\approx 50 \mu\text{L}^{-1}$), revelou ser compatível com a presença de guppies, em exposições com duração de 3 a 28 dias. Também é de assinalar que os nossos resultados estão em consonância com um estudo recente, no qual se estimou, o NOEC e o LOEC para alterações comportamentais do guppy (nado errático, letargia, desequilíbrio, imobilidade), após exposição a Spinosade, reportando concentrações de 12,6 e 25,3 (mgL^{-1}), respetivamente (Pereira et al., 2016); portanto, mais elevadas do que as utilizadas por nós neste trabalho.

A diferença entre o modo de ação do DDT e Abate relativamente ao Spinosade poderá estar relacionada com o facto deste último atuar sobre subtipos de recetores nicotínicos, ainda não identificados (Lumaret et al. 2012) em alternativa aos clássicos recetores de acetilcolina nicotínicos (Kirst 2010). Parece evidente que são necessários mais estudos fundamentais para se perceberem as diferenças que vão emergindo.

5. CONCLUSÕES

Em conclusão, considerando a possibilidade e mesmo evidências de que a artémia salina pode apresentar uma resistência aos pesticidas equivalente ao das larvas de mosquito, estas foram usadas como organismos teste em bioensaios com três pesticidas com ação larvívora, inclusivamente contra larvas de mosquitos. Estes ensaios revelaram que o Spinosade apresentou uma taxa de mortalidade para a artémia semelhante à do DDT, que é o pesticida usado por excelência no controlo da propagação da malária, mas que devido à sua toxicidade (para o ambiente e humanos) tem sido banido de muitos países. Pelo contrário, o Abate revelou-se incapaz de induzir a mortalidade em náuplios de artémia. Assumindo que o modelo artémia é representativo do que possa suceder com larvas de mosquitos, os dados sugerem que para o objetivo de controlar quimicamente a propagação das larvas de mosquito, o Spinosade parece ser o pesticida mais indicado. Naturalmente, que é necessária a confirmação desta hipótese usando larvas de mosquito, preferencialmente endémicas da zona que se pretende intervencionar, no sentido de aferir a dose mais adequada. De qualquer modo, registou-se aqui que há já resultados publicados que suportam a nossa inferência.

Uma vez que a ideia principal deste trabalho foi associar pesticidas que matem larvas de mosquito, eventualmente portadores do plasmódio da malária, a peixes larvívoros que se alimentem das restantes, vivas, eventualmente fragilizadas pela presença de um larvívoro, foi também avaliado neste estudo qual o impacto que o DDT, Spinosade e o Abate têm em parâmetros de performance alimentar de guppies. Estes são peixes larvívoros que têm sido amplamente usados no controlo biológico da propagação da malária em vários pontos do globo. Neste caso, o Spinosade também se mostrou como sendo o larvívoro aparentemente mais adequado, pois ao contrário dos restantes, não produziu qualquer efeito negativo sobre a capacidade predatória desta espécie, medida como o tempo despendido na ingestão de presas à sua disposição (no caso náuplios de artémias), que não diferiu significativamente da situação controlo. Perspetivando uma situação com uso de larvas de mosquito, o larvívoro teria capacidade de matar uma série de larvas, podendo o guppy conseguir em paralelo aumentar o número de larvas mortas através de predação de larvas resistentes ou fragilizadas. Este cenário hipotético é realista e bem corroborado pelo estudo recente de Anogwih et al. (2015), que explorou o mesmo tipo de conceito que esta dissertação investigou.

Portanto a conjugação entre o controlo químico promovido pelo Spinosade e o controlo biológico baseado no uso de guppies surge como mais uma ferramenta válida e com um significativo potencial a explorar no combate à propagação da malária.

6. REFERÊNCIAS

- Abe, F. R., A. C. Coleone, A. A. Machado, and G. Machado-Neto (2014) "Ecotoxicity and environmental risk assessment of larvicides used in the control of *Aedes aegypti* to *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera)." Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A **77**(1-3): 37-45.
- Anogwih, J., J. Saliu, E. W. Linton, W. A. Makanjuola, and L. Chukwu (2013) "The compatibility of Spindor dust with *Poecilia Reticulata* for integrated mosquito larviciding." Journal of Clinical Research & Bioethics **4**(4): 157.
- Anogwih, J. A., and W. A. Makanjuola (2010) "Predator-prey density of *Poecilia reticulata* (guppy) under laboratory investigation." The Zoologist **8**: 47-51.
- Anogwih, J. A., W. A. Makanjuola, and L.O. Chukwu (2015) "Potential for integrated control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) using larvicides and guppies." Biological Control **81**: 31-36.
- ASTM (2004) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM International, West Conshohocken, PA, 1-22.
- Bahgat, I., G. El Kady, S. A. Temerak, and M. Lysandrou (2007) "The natural bio-insecticide spinosad and its toxicity to combat some mosquito species in Ismailia Governorate, Egypt." World Journal of Agricultural Sciences **3**: 396-400.
- Bischoff, R., J. Gould, and D. I. Rubenstein (1985) "Tail size and female choice in the guppy (*Poecilia reticulata*)." Behavioral Ecology and Sociobiology **17**(3): 253-255.
- N'Guessan R., P. Boko, A. Odjo, J. Chabi, M. Akogbeto, and M. Rowland (2010) "Control of pyrethroid and DDT-resistant *Anopheles gambiae* by application of indoor residual spraying or mosquito nets treated with a long-lasting organophosphate insecticide, chlorpyrifos-methyl." Malaria Journal **9**:44.
- Bond, J., C. Marina, and T. Williams (2004) "The naturally-derived insecticide spinosad is highly toxic to *Aedes* and *Anopheles* mosquito larvae." Medical and Veterinary Entomology **18**(1): 50-56.
- Bustos-Obregon, E., and Á. Vargas (2010) "Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate diazinon." Biological Research **43**(3): 357-362.
- Chandra, G., I. Bhattacharjee, S. N. Chatterjee, and A. Ghosh (2008) "Mosquito control by larvivorous fish." Indian Journal of Medical Research **127**(1): 13.

- Chatterjee, S. N. and G. Chandra (1997) "Feeding pattern of *Gambusia affinis* and *Lebistes reticulatus* on *Anopheles subpictus* larvae in the laboratory and field conditions." Journal of Applied Zoological Researches **8**: 152-153.
- Cohen, J.M, D. L. Smith, C. Cotter, A. Ward, G. Yamey, O. J. Sabot and B. Moonen (2012) "Malaria resurgence: a systematic review and assessment of its causes". Malaria Journal **11**:122.
- Connelly, C. and D. B. Carlson (Eds) (2009) "Florida Coordinating Council on mosquito control. Florida Mosquito Control: the state of the mission as defined by mosquito controllers, regulators, and environmental managers". Vero Beach, FL: University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences, Florida Medical Entomology Laboratory.
- Crompton, P. D., J. Moebius, S. Portugal, M. Waisberg, G. Hart, L.S. Garver, L. H. Miller, C. Barillas-Mury, and S. K. Pierce (2014) "Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease." Annual Review of Immunology **32**:157-87.
- Caldas de Castro, M., Y. Yamagata, D. Mtasiwa, M. Tanner, J. Utzinger, J. Keiser and B. H. Singer (2004) "Integrated urban malaria control: a case study in Dar es Salaam, Tanzania." American Journal of Tropical Medicine Hygiene **71**(2): 103-117.
- Deacon, A. E., I. W. Ramnarine and A. E. Magurran (2011) "How reproductive ecology contributes to the spread of a globally invasive fish". PLoS ONE **6**: e24416.
- DeLorenzo, M. E., G. I. Scott, P. E., Ross (2001) "Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(1): 84-98.
- Dua, V.K., A. Pandey, S. Rai and A. Dash (2007) "Larvivorous activity of *Poecilia reticulata* against *Culex quinquefasciatus* larvae in a polluted water drain in Hardwar, India." Journal of the American Mosquito Control Association **23**(4): 481–483.
- Dumitrascu, M. (2011) "*Artemia salina*." Balneo-Research Journal **2**(4): 119-122.
- Dvorak, P., K. Benova, and J. Vitek (2012) "Alternative biotest on *Artemia franciscana*." In: Ecotoxicology, G. Begum (Ed.), InTech: 51-74.
- Edward, J., and O. Sogbesan (2007) "Toxicity Effect of Temephos on *Bulinus globosus* and *Lymnaea natalensis*." Advances in Biological Research **1**(3-4): 130-133.
- Fan, S., R. Segawa, D. Kim, J. Levine, C. Ganapathy, P. Wofford, J. Hsu, and P. Lee (2008) "Environmental Monitoring Results Of Spinosad Aerial Applications For The Mexican Fruit Fly Eradication In Valley Center, San Diego County, 2003." California Environmental Protection Agency Department of Pesticide Regulation: 1-97.

- Ghosh, A., M. Mandal, I. Bhattacharjee, and G. Chandra (2005) "Biological control of vector mosquitoes by some common exotic fish predators." Turkish Journal of Biology **29**: 167-171.
- Godfray, H. C. J. (2013) "Mosquito ecology and control of malaria." Journal of Animal Ecology **82**(1): 15-25.
- Gopaul, R. (1995) "Entomological surveillance in Mauritius." Sante **5**(6): 401-405.
- Gratz, N. G. (1999) "Emerging and resurging vector-borne diseases." Annual Review of Entomology **44**: 51-75.
- Gupta, D. K., R. M. Bhatt, R. C. Sharma, A. S. Gautam, and Rajnikant (1992) "Intrado-mestic mosquito breeding sources and their management." Indian Journal of Malariology **29**(1): 41-46.
- Hertlein, M., C. Mavrotas, C. Jousseume, M. Lysandrou, G. D. Thompson, W. Jany, and S. A. Ritchie (2010) "A review of spinosad as a natural mosquito product for larval mosquito control." Journal of the American Mosquito Control Association **26**: 67-87.
- IUPAC (2015) "DDT (Ref: OMS 16)." Global availability of information on agrochemicals. (<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/204.htm>, 29-09-2016).
- Kamareddine, L. (2012) "The biological control of the malaria vector." Toxins **4**(9): 748-767.
- Keiser, J., B. H. Singer, and J. Utzinger (2005) "Reducing the burden of malaria in different eco-epidemiological settings with environmental management: a systematic review." The Lancet Infectious Diseases **5**(11): 695-708.
- Keiser, J., J. Utzinger, M. Caldas de Castro, T. A. Smith, M. Tanner, and B. H. Singer (2004) "Urbanization in Sub-Saharan Africa and implication for malaria control." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **71**(2 suppl): 118-127.
- Kemabonta, K. A., and A. E. Nwankwo (2013) "Larvicidal effectiveness of spinosad and temephos on *Anopheles gambiae* & *Aedes aegypti*." International Journal of Science and Nature **4**(2): 214-222.
- Killeen, G., U. Fillinger, and B. G. Knols (2002) "Advantages of larval control for African malaria vectors: Low mobility and behavioural responsiveness of immature mosquito stages allow high effective coverage." Malaria Journal **1**(1): 8.
- Killeen, G. F., U. Fillinger, I. Kiche, L. C. Gouagna, and B. G. Knols (2002) "Eradication of *Anopheles gambiae* from Brazil: lessons for malaria control in Africa?" The Lancet Infectious Diseases **2**(10): 618-627.
- Kirdsook, P. (1993) "Evaluation of Artemia suitability for toxicity test of pesticides." Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

- Kirst, H. A. (2010). "The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research." The Journal of Antibiotics **63**(3): 101-111.
- Kokkali, V., I. Katramados, and J. D. Newman (2011) "Monitoring the effect of metal ions on the mobility of *Artemia salina* nauplii." Biosensors **1**(2): 36-45.
- Kollman, W. S. (2003) Environmental Fate of Spinosad. California Department of Pesticide Regulation. Environmental Monitoring Branch. 16 pp.
- Lacey, L. A. and C. M. Lacey (1990). "The medical importance of riceland mosquitoes and their control using alternatives to chemical insecticides." Journal of the American Mosquito Control Association. Supplement **2**: 1-93.
- Laitano, K. d. S., and W. G. Matias (2006) "Testes de toxicidade com *Daphnia magna*: uma ferramenta para avaliação de um reator experimental UASB." Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology **1**(1): 43-47.
- Lewis, P. A., D. J. Klemm, J. M. Lazorchak, T. J. Norberg-King, W. H. Peltier, and M. A. Heber (1994) "Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms." Third Edition, US Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring Systems Laboratory.
- Lindsay, S., M. Kirby, E. Baris, and R. Bos (2004) "Environmental management for malaria control in the East Asia and Pacific (EAP) Region." The World Bank, Washington, DC., USA. 66 p.
- Lumaret, J.-P., F. Errouissi, K. Floate, J. Römbke, and K. Wardhaugh (2012) "A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments." Current Pharmaceutical Biotechnology **13**(6): 1004-1060.
- Mannaa, B., G. Adityaa, and S. Banerjee (2008) "Vulnerability of the mosquito larvae to the guppies (*Poecilia reticulata*) in the presence of alternative preys." Journal of Vector Borne Diseases **45**(3): 200-206.
- Marina, C., J. Bond, J. Muñoz, J. Valle, N. Chirino, and T. Williams (2012) "Spinosad: a biorational mosquito larvicide for use in car tires in southern Mexico." Parasites & Vectors **5**(1): 95.
- Marten, G. G., W. Che, and E. S. Bordes (1993) "Compatibility of cyclopoid copepods with mosquito insecticides." Journal of the American Mosquito Control Association **9**: 150-150.
- Mohamed, A. A. (2003) "Study of larvivorous fish for malaria vector control in Somalia, 2002." Eastern Mediterranean Health Journal **9**(4): 618-626.

- Mutunga, J. M., T. D. Anderson, D. T. Craft, A. D. Gross, D. R. Swale, F. Tong, D. M. Wong, P. R. Carlier and J. R. Bloomquist (2015) "Carbamate and pyrethroid resistance in the akron strain of *Anopheles gambiae*." Pesticide Biochemistry and Physiology 121: 116-121.
- Naceur, H. B., A. B. Rejeb Jenhani, M. El Cafsi, and M. S. Romdhane (2008) "Determination of biological characteristics of *Artemia salina* (Crustacea: Anostraca) population from Sabkhet Sijoumi (NE Tunisia)" Transitional Waters Bulletin 2(3): 65-74.
- Nalim, S., and D. Tribuwono (1987) "Control demonstration of the ricefield breeding mosquito *Anopheles aconitus* Donitz in central java, using *Poecilia reticulata* through community participation: 2. Culturing, distribution and use of fish in the field." Buletin Penelitian Kesehatan 15(4): 1-7.
- Nazni, W., H. Lee, and A. H. Azahari (2005) "Adult and larval insecticide susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Say) mosquitoes in Kuala Lumpur Malaysia." Tropical Biomedicine 22(1): 63-68.
- Nunes, B. S., F. D. Carvalho, L. M. Guilhermino, and G. Van Stappen G. (2006) "Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing." Environmental Pollution 144(2): 453-462.
- OECD (1989) "Partition Coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method." Test No. 117, OECD Publishing. 11 pp.
- Parvez, S. D., and S. S. Al-Wahaibi (2003) "Comparison of three larviciding options for malaria vector control." Eastern Mediterranean Health Journal 9(4): 627-636.
- Patin, S. A. (1982) Pollution and the Biological Resources of the Oceans. London
- Pereira, B. B., E. S. Caixeta, P. C. Freitas, V. S. Santos, J. E. Limongi, E. de Campos Júnior, C. F. Campos, H. N. Souto, T. S. Rodrigues, and S. Morelli (2016) "Toxicological assessment of spinosad: Implications for integrated control of *Aedes aegypti* using larvicides and larvivorous fish." Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A 79(12): 477-481.
- Pereira, B. B., and E. A. Oliveira (2014) "Larvovirous potencial of *Poecilia reticulata* at domestic biological control conditions." Cadernos Saúde Coletiva 22(3): 241-245.
- Raghavendra, K., and S. K. Subbarao (2002) "Chemical insecticides in malaria vector control in India." ICMR Bulletin 32: 93-99.
- Raghavendra, K., V. Verma, H. C. Srivastava, K. Gunasekaran, U. Sreehari, and D. A. Dash (2010) "Persistence of DDT, malathion & deltamethrin resistance in *Anopheles culicifacies* after their sequential withdrawal from indoor residual spraying in Surat district, India." Indian Journal of Medical Research 132: 260-264.

- Rajabi, S., A. Ramazani, M. Hamidi, and T. Naji (2015) "*Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles." DARU Journal of Pharmaceutical Sciences **23**(1): 20.
- Rajnikant, R. M. Bhatt, D. K. Gupta, R. C. Sharma, H. C. Srivastava, A. S. Gautam (1993) "Observations on mosquito breeding in wells and its control." Indian Journal of Malariology **30**(4): 215-220.
- Ramirez, J. L., L. S. Garver and G. Dimopoulos (2009) "Challenges and approaches for mosquito targeted malaria control." Current Molecular Medicine **9**(2): 116-130.
- Rand, G. M. (1995). Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment. Second Edition, CRC Press. 1148 p.
- Randell, H., K. Dickinson, E. H. Shayo, L. E. Mboera, and R. A. Kramer (2010) "Environmental management for malaria control: knowledge and practices in Mvomero, Tanzania." EcoHealth **7**(4): 507-516.
- Rotini, A., L. Manfra, S. Canepa, A. Tornambé, and L. Migliori (2015) "Can *Artemia* hatching assay be a (sensitive) alternative tool to acute toxicity test?" Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **95**(6): 1-7.
- Rupp, H. (1996). "Adverse assessments of *Gambusia affinis*: an alternate view for mosquito control practitioners." Journal of the American Mosquito Control Association **12**(2 Pt 1): 155-159; discussion 160-156.
- Sabatinelli, G., S. Blanchy, G. Majori, and M. Papakay (1991) "Impact de l'utilisation du poisson larvifère *Poecilia reticulata* sur la transmission du paludisme en RFI des Comores." Annales de Parasitologie Humaine et Comparée **66**: 84-88.
- Said, T. O., K. M. El Moselhy, A. A. Rashad, M. A. Shreadah (2008). "Organochlorine contaminants in water, sediment and fish of Lake Burullus, Egyptian Mediterranean Sea." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **81**(2): 136-146.
- Sánchez-Fortún, S., F. Sanz-Barrera, and M. V. Barahona-Gomariz (1995). "Acute toxicities of selected insecticides to the aquatic arthropod *Artemia salina*." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **54**(1): 76-82.
- Sevane E, R. González, and C. Menéndez (2010) Current knowledge and challenges of antimalarial drugs for treatment and prevention in pregnancy. Expert Opinion on Pharmacotherapy **11**(8):1277-1293.
- Shiff, C. (2002). "Integrated approach to malaria control." Clinical Microbiology Reviews **15**(2): 278-293.
- Teklehaimanot, A., B. Singer, A. Speilman, Y Tozan, and A. Schapira (2005) Coming to grips with malaria in the new millennium. UN Millenium Project, Earthscan. 129 p.

- Thompson, G. D., R. Dutton, and T. C. Sparks (2000) "Spinosad – a case study: an example from a natural products discovery programme." Pest Management Science **56**(8): 696-702.
- UNICEF (2010). Malaria prevention and treatment. The Prescriber **18**: 1-16.
- Utzinger, J., Y. Tozan, and B. H. Singer (2001) "Efficacy and cost-effectiveness of environmental management for malaria control." Tropical Medicine & International Health **6**(9): 677-687.
- Vanhaecke, P., and G. Persoone (1984) "The ARC-test: a standardized short-term routine toxicity test with *Artemia* nauplii: methodology and evaluation." In: Ecotoxicology for the Marine Environment. Vol. 2. G. Persoone, E. Jaspers, and C. Claus (Eds.). State University of Ghent and Institute of Marine Science and Research, Bredene, Belgium. 588 p.
- Varó, I., F. Amat, J. C. Navarro, M. Barreda, E. Pitarch, and R. Serrano (2006) "Assessment of the efficacy of *Artemia* sp. (Crustacea) cysts chorion as barrier to chlorpyrifos (organophosphorus pesticide) exposure. Effect on hatching and survival." Science of the Total Environment **366**(1): 148-153.
- Varó, I., A. C. Taylor, M. D. Ferrando, and F. Amat (1997) "Effect of endosulfan pesticide on the oxygen consumption rates of nauplii of different Spanish strains of *Artemia*." Journal of Environmental Science and Health, Part B **32**(3): 363-375.
- Vatandoost, H. and A. Hanafi-Bojd (2005) "Current resistant status of *Anopheles stephensi* Liston to different larvicides in hormozgan province, southeastern Iran, 2004." Pakistan Journal of Biological Sciences **8**: 1568-1570.
- Vogel, G. (2002) In pursuit of a killer. Science **298**(5591): 87-89.
- Walker, K. (2002) A Review of Control Methods for African Malaria Vectors. Environmental Health Project. US Agency for International Development. 42 pp.
- Walker, K. and M. Lynch (2007) "Contributions of Anopheles larval control to malaria suppression in tropical Africa: review of achievements and potential." Medical and Veterinary Entomology **21**(1): 2-21.
- Walshe, D. P., P. Garner, A. A. Abdel-Hameed Adeel, G. H. Pyke, and T. Burkot (2013) "Larvivorous fish for preventing malaria transmission." The Cochrane Database of Systematic Reviews (12): 1-65.
- Welcomme, R. (1992) "A history of international introductions of inland aquatic species. Introductions and transfers of aquatic species." ICES Marine Science Symposium. Copenhagen, Denmark: ICES, 3-14.
- WHO (2011) WHO specifications and evaluations for public health pesticides. Temephos. World Health Organization, Switzerland. 44 p.

- Williams, T., J. Valle, and E. Viñuela (2003) "Is the Naturally Derived Insecticide Spinosad® Compatible with Insect Natural Enemies?" Biocontrol Science and Technology **13**(5): 459-475.
- Wu, N., G. Liao, F. Li, Y. L. Luo, and G. M. Zhong (1991) "The advantages of mosquito biocontrol by stocking edible fish in rice paddies." The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health **22**(3): 436-442.
- Xu, D., and G. Liu (2014) "The effects of DDT on the feeding, respiration, survival, and reproduction of *Sinocalanus tenellus* (Copepoda: Calanoida)." Acta Oceanologica Sinica **33**(9): 133-138.
- Yap, H. H. (1985) "Biological control of mosquitoes, especially malaria vectors, *Anopheles* species." The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health **16**(1): 163-172.